

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Nuevos adyuvantes en la inmunoterapia específica de las enfermedades  
alérgicas:**

**Estudio de aspectos inmunológicos, celulares y repercusión funcional  
respiratoria en un modelo animal de asma bronquial**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA**

**PRESENTADA POR**

**María Vázquez de la Torre Gaspar**

Directores

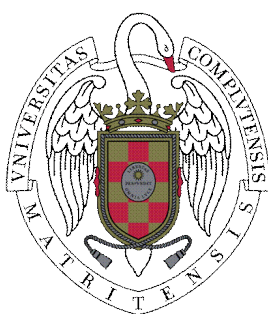
José Manuel Zubeldia Ortuño  
Rafael Enríquez de Salamanca Lorente

**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

**NUEVOS ADYUVANTES EN LA INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA DE  
LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS:**

Estudio de aspectos inmunológicos, celulares y repercusión  
funcional respiratoria en un modelo animal de asma bronquial

Presentada por:

**María Vázquez de la Torre Gaspar**

Co-dirigida por:

Profesor Jose Manuel Zubeldia Ortuño

Profesor Rafael Enríquez de Salamanca Lorente

Madrid, 2015

**D. Jose Manuel Zubeldia Ortuño y D. Rafael Enríquez de Salamanca Lorente**

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo de investigación titulado **Nuevos Adyuvantes En La Inmunoterapia Específica De Las Enfermedades Alérgicas: “Estudio de aspectos inmunológicos, celulares y repercusión funcional respiratoria en un modelo animal de asma bronquial”**, ha sido realizado bajo su dirección por la Licenciada en Medicina **D<sup>a</sup> María Vázquez de la Torre Gaspar**, y reúne todos los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que así conste a todos los efectos, se extiende la presente certificación en Madrid, a 10 de Marzo del 2015



D. José Manuel Zubeldia Ortuño



D. Rafael Enríquez de Salamanca Lorente

Este trabajo ha sido realizado en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Servicio de Alergia, Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, bajo la dirección del Dr. José Manuel Zubeldia Ortuño y el Dr Rafael Enríquez de Salamanca Lorente, con la ayuda de Beca Post MIR de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (2007-2008) y Beca de la Fundación MMA de Investigación médica (2007)

**A Guillermo, Paula y Jorge**

**A mis padres**

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas, sin las cuales, este trabajo no habría visto la luz.

En primer lugar, al Dr. Jose Manuel Zubeldia, codirector de esta tesis. Por confiar en mí para la realización de este trabajo. Por enseñarme a pensar con mentalidad científica. Por sus críticas y comentarios, que me han hecho crecer como profesional. Por recibirme siempre con una sonrisa.

Al profesor Rafael Enríquez de Salamanca, codirector de esta tesis. Por su disponibilidad y asesoramiento, aportando valiosas correcciones. Por facilitarme la realización de este trabajo.

A la Dra. María Luisa Baeza, por su ayuda desinteresada en la realización de este proyecto. Por sus excelentes y acertados comentarios, por transmitirme confianza y seguridad en mis resultados.

A Yoko Higaki. Gracias por enseñarme a desarrollar las técnicas de laboratorio realizadas en este proyecto, y por transmitirme la importancia de ser rigurosa y metódica.

A la Dra. Laura Nájera, especialista en Anatomía Patológica, por su ayuda desinteresada en la interpretación de las muestras de tejido pulmonar.

A todos los residentes de Alergia que rotaron conmigo en el experimental, Leli Gacías, Eva Razzak, Lorena Sánchez y, muy en especial, a Alejandro de la Rotta. Por pasar muchas horas conmigo en el laboratorio, y compartir las alegrías y sinsabores que ha dado este proyecto.

A la Dra. Ana Villanueva, por ayudarme siempre que está en su mano. Por acompañarme a “pinchar ratones” en fin de semana. Por ser una gran amiga.

A Guillermo, por su apoyo y comprensión, en este, y en todos los demás aspectos de mi vida.

Muchas gracias a todos.

## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	11
<b>RESUMEN</b>	14
<b>SUMMARY</b>	22
<b>INTRODUCCION</b>	30
1. Enfermedades alérgicas: concepto y fisiopatología	31
1.1 Presentación antigénica	32
1.2 Respuesta de linfocitos T	33
1.3 Linfocitos B	38
1.4 Células efectoras de la respuesta alérgica	38
2. Asma bronquial: concepto y patogenia	41
3. Inmunoterapia específica con alérgenos para el tratamiento de las enfermedades alérgicas	42
3.1 Mecanismo de acción de la inmunoterapia	42
3.1.1 Respuesta de linfocitos T frente a la inmunoterapia específica	44
3.1.2 Respuesta de Inmunoglobulinas a la inmunoterapia específica	44
3.1.3 Cambios en las células efectoras	46
4. Adyuvantes en inmunoterapia específica	46
4.1 Mecanismo de acción de los adyuvantes utilizados en la inmunoterapia	46
4.2 Hidróxido de aluminio	51
4.3 Fosfato cálcico	54
4.4 Monofosforil lípido A	55
4.5 Secuencias inmunoestimuladoras (CpG-ODN)	58
5. Modelos murinos de inflamación pulmonar alérgica	62

<b>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	66
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	68
1. Materiales	69
1.1 Animales	69
1.2 Alérgenos	70
1.3 Adyuvantes	70
1.4 ELISA: Anticuerpos, reactivos y material plástico	70
1.5 Cultivos celulares	72
1.6 Otros reactivos	73
1.7 Aparatos empleados	73
2. Métodos	74
2.1 Diseño experimental para el estudio de la respuesta inmune primaria a la co-administración de <i>O. europaea</i> y adyuvantes	74
2.2 Modelo experimental de inflamación bronquial alérgica por sensibilización a polen de <i>O. europaea</i>	76
2.3 Diseño experimental para el estudio de la respuesta inmune secundaria a la co-administración de olea y adyuvantes en ratones sensibilizados a polen de <i>O. europaea</i>	77
2.4 Análisis de la inmunidad humoral	79
2.4.1 IgG1 e IgG2a	80
2.4.2 IgE	81
2.5 Análisis de la inmunidad celular	82



2.5.1 Cultivo de esplenocitos	82
2.5.2 Determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos	82
2.5.2.1 IL-4 e IFN- $\gamma$	82
2.5.2.2 IL-5 e IL-1	83
2.6 Estudio no invasivo de la función pulmonar	84
2.7 Estudio histopatológico de los pulmones	87
2.7.1 Tinción de hematoxilina y eosina	87
2.7.2 Tinción de ácido periódico y reactivo de Schiff	88
2.8 Análisis estadístico y presentación de los datos	88
<b>RESULTADOS</b>	90
1. Efecto de la administración de adyuvantes asociados a polen de <i>Olea europaea</i> en ratones sanos	91
1.1 Estudio de la respuesta inmune primaria	91
1.1.1 Estudio de la respuesta inmune humoral	91
1.1.1.1 Determinación de IgG1 específica	92
1.1.1.2 Determinación de IgG2a específica	93
1.1.2 Secreción de citocinas <i>ex vivo</i>	95
1.1.2.1 Secreción de IL4 específica	95
1.1.2.2 Secreción de IFN- $\gamma$ específica	97
1.2 Estudio no invasivo de la función respiratoria mediante pletismografía corporal total	98
1.3. Estudio de la histología pulmonar: infiltrados celulares y secreción de moco	99

2. Efecto sistémico de la administración de un alérgeno, polen de <i>Olea europaea</i> , asociado a hidróxido de aluminio	103
2.1 Efecto inmunológico: determinación de IgG1 específica	103
2.2 Efecto sobre la función respiratoria: hiperreactividad bronquial	106
3. Efecto de la administración de adyuvantes asociados a un alérgeno, en ratones sensibilizados a polen de <i>Olea europaea</i>	108
3.1 Estudio de la respuesta inmune secundaria	108
3.1.1 Determinación de inmunoglobulinas séricas específicas	108
3.1.1.1 Determinación de IgG1	108
3.1.1.2 Determinación de IgE	110
3.1.1.3 Determinación de IgG2a	111
3.1.2 Producción <i>ex vivo</i> de citocinas específicas	112
3.1.2.1 Citocinas Th2	113
3.1.2.2 Citocinas Th1	115
3.1.2.3 Citocinas Treg	116
3.2 Influencia de los diferentes tratamientos sobre la hiperreactividad bronquial de los ratones sensibilizados a polen de <i>Olea europaea</i>	118
3.3 Efecto de los diferentes tratamientos sobre la histología pulmonar en ratones sensibilizados a polen de <i>Olea europaea</i>	120
	124

## DISCUSION

1. Modelo murino de inflamación pulmonar alérgica por sensibilización a polen de <i>Olea europaea</i>	126
2. Influencia de los adyuvantes en la respuesta inmune primaria	127
2.1 Respuesta inmune humoral primaria	127
2.2 Respuesta inmune celular primaria	129
3. Cambios inducidos por la co-administración de adyuvante y alérgeno en ratones sanos en el órgano diana: función pulmonar e histopatología pulmonar	131
4. Cambios inmunológicos provocados por la co- administración de adyuvante y alérgeno en un modelo murino de inflamación pulmonar alérgica	133
4.1 Respuesta inmune humoral secundaria	133
4.2 Producción de citocinas en la respuesta inmune secundaria	136
5. Respuesta pulmonar a la administración de adyuvante y alérgeno en modelo murino de inflamación pulmonar alérgica	138

CONCLUSIONES	141
--------------	-----

BIBLIOGRAFIA	143
--------------	-----

## **ABREVIATURAS**

APC:	Célula presentadora de antígeno
CpG:	Dinucleótido de citosina-guanina
<i>Der p:</i>	<i>Dermathophagoides pteronyssinus</i>
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ECM:	Matriz extracelular
ECP:	Proteína catiónica del eosinófilo
EDN:	Neurotoxina derivada del eosinófilo
EEM:	Error estándar de la media
EPO:	Peroxidasa del eosinófilo
FcεRI:	Receptor de alta afinidad para la IgE
FGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HRB:	Hiperreactividad bronquial
i.d.:	Intradérmico
i.m.:	Intramuscular
i.p.:	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IFN:	Interferón
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleucina
ISS:	Secuencias inmunoestimuladoras de ADN
ITE:	Inmunoterapia específica
iTreg:	Linfocito T regulador inducido
LBA:	Lavado broncoalveolar
LRR:	Repeticiones ricas en leucina
MBP:	Proteína básica principal
MPL:	Monofosforil lípido A
MPO:	Mieloperoxidasa
MyD88:	Factor de diferenciación mieloide 88
NFκB:	Factor nuclear kappa B
NK:	Linfocito NK (linfocito citolítico espontáneo)
nTreg:	Linfocito T regulador natural
ODN:	Oligonucleótidos tiofosforados sintéticos
OVA:	Ovoalbúmina
OX40L:	Ligando de OX40
PAF:	Factor activador de plaquetas
PAMPs:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAS:	Ácido periódico y reactivo de Schiff
PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica
PBS:	Tampón fosfato salino

PRRs:	Receptor de reconocimiento de patrones
ROR $\gamma$ t:	Receptor nuclear huérfano gamma, relacionado con el ácido retinoico
s.c.:	Subcutáneo
STAT:	Factor transductor de la señal y activador de la transcripción
TGF- $\beta$ :	Factor de crecimiento transformador beta
Th:	Linfocito T cooperador
TIM:	Proteína con dominio de mucina y dominio de inmunoglobulina del linfocito T
TIR:	Dominio citoplasmático similar al del receptor de IL-1
TLRs:	Receptores del tipo Toll
TLSP:	Linfopoyetina del estroma tímico
TMB:	Tetrametil bencidina
TNF:	Factor de necrosis tumoral
Treg:	Linfocito T regulador
TRIF:	Dominio TIR contiene el adaptador para la inducción de IFN- $\beta$
UA:	Unidades arbitrarias

## RESUMEN

## **RESUMEN:**

### **INTRODUCCIÓN**

La inmunoterapia específica (ITE) con alérgenos consiste en la administración de cantidades gradualmente crecientes de un extracto alérgico a un sujeto alérgico para mejorar la sintomatología causada por la exposición posterior al alérgeno causante. La ITE induce tolerancia clínica e inmunológica, tiene eficacia a largo plazo, previene la progresión de la enfermedad y mejora la calidad de vida de los pacientes alérgicos.

Los adyuvantes son sustancias que se administran junto con la proteína antigénica en las vacunas. Su función es potenciar, mediante diferentes mecanismos, el efecto terapéutico del alérgeno con el que es co-administrado. La propiedad fundamental de un adyuvante es, por tanto, el aumento de la inmunogenicidad del extracto. Para ello debe potenciar la inducción de linfocitos T específicos que produzcan IL-10 y aumentar el perfil de citocinas Th1.

En la actualidad, el hidróxido de aluminio es el adyuvante más ampliamente utilizado en la ITE con alérgenos. Aproximadamente el 75% de las formulaciones para inmunoterapia subcutánea incluyen aluminio, habiendo probado su eficacia y buen perfil de seguridad. La principal función del aluminio como adyuvante es el proporcionar un efecto depot, es decir, obtener una liberación retardada de los alérgenos desde el lugar de administración.

Por otro lado, el aluminio se utiliza frecuentemente en los modelos murinos para la inducción de la inflamación alérgica, dado su capacidad de inducir una respuesta Th2 cuando se administra por vía s.c. asociado a un antígeno. Esto es un efecto no deseado del aluminio cuando se utiliza como adyuvante de ITE.

El aluminio se considera un adyuvante seguro. Sin embargo, el uso de aluminio como adyuvante, contribuye directa y significativamente a la carga corporal de aluminio de un individuo. El aluminio es escasamente soluble, por lo que se distribuye formando depósitos focales, que se localizaran en el lugar de la inyección, dando lugar a efectos



adversos, los más frecuentes los granulomas moderado-severo, o pueden ser transportados a otras regiones, como ganglios linfáticos o cerebro, zonas en las que el aluminio puede producir efectos tóxicos. La inflamación y los eventos oxidativos que provoca el aluminio se han relacionado con la neurodegeneración que se produce en la enfermedad de Alzheimer. Además se ha relacionado el aumento de incidencia de autismo con el número de vacunas con aluminio recibidas en la primera infancia.

Otro adyuvante, el fosfato cálcico, se utiliza desde hace años para inducir modificaciones físicas en los alérgenos, dando lugar a un efecto depot, que disminuye la incidencia de reacciones adversas, mientras que provee al extracto de suficiente inmunogenicidad para conseguir un efecto clínico significativo. El fosfato cálcico es un constituyente normal del cuerpo humano, por lo que es bien tolerado y fácilmente reabsorbido. Habitualmente es considerado muy seguro, y se utiliza, en ocasiones, como alternativa al aluminio, ya que no produce nódulos subcutáneos. Por el contrario, otros autores describen reacciones inflamatorias locales.

Por otro lado, existen adyuvantes, cuyo mecanismo de acción se basa en la activación del sistema inmune innato mediante el uso de patógenos. Esta acción se basa en el efecto agonista de estos adyuvantes sobre receptores TLR, presentes en células dendríticas, neutrófilos, macrófagos y linfocitos citolíticos espontáneos (NK) del sistema inmune innato. Según el TLR que se potencie, se activan diferentes vías de señalización, lo que proporciona la posibilidad de controlar la sobreexpresión de citocinas Th2 o modificar el balance Th1/Th2 hacia Th1.

Dentro de los adyuvantes inmunoestimuladores se encuentra monofosforil lípido A, que ha sido aprobado en los últimos años como adyuvante en inmunoterapia específica. Es un lipopolisacárido purificado extraído de la pared celular de la *Salmonella minnesota R595*. El mecanismo de acción de MPL como adyuvante radica en la función agonista parcial sobre los receptores TLR4. Otro adyuvante conocido por sus propiedades inmunoestimuladoras son las secuencias inmunoestimuladoras de ADN (ISS). El patrón de secuencia de bases responsable de esta propiedad es un dinucleótido de citosina-guanina no metilado (CpG), que está presente con una

frecuencia significativamente mayor en el ADN bacteriano que en el ADN de mamíferos. Estas secuencias CpG no metiladas actúan como ligandos de TLR9.

En resumen, las sales de aluminio se vienen utilizando tradicionalmente, como adyuvante de la ITE s.c. convencional, aunque paradójicamente, en modelos de experimentación animal, se utiliza como un inductor de respuesta Th2. La identificación de adyuvantes alternativos que indujeran una respuesta Th1 y T reguladora, mejoraría la eficacia de la ITE como tratamiento para el asma y otras enfermedades alérgicas. No existen en la literatura científica suficientes estudios que comparen la eficacia ni el mecanismo de acción de estos adyuvantes entre sí. Sobre esta base, se propone realizar un estudio que compare la eficacia de cada uno de los adyuvantes, desde un punto de vista inmunológico, de función respiratoria e histología pulmonar.

## **OBJETIVOS**

El objetivo general de este proyecto es la comparación de la eficacia, clínica e inmunológica, de diferentes adyuvantes para inmunoterapia específica de las enfermedades alérgicas en un modelo experimental murino.

Los objetivos concretos que nos proponemos son:

1. Comparar el efecto inmunológico “in vitro” de diferentes adyuvantes utilizados en inmunoterapia para las enfermedades alérgicas, mediante la determinación de inmunoglobulinas específicas y su repercusión sobre el perfil de citocinas:

1.1 Estudio comparativo de la respuesta inmune primaria de los adyuvantes en ratones sanos

1.2. Estudio comparativo de la respuesta inmune secundaria de los adyuvantes en el modelo de inflamación bronquial alérgica por sensibilización a polen de *O. europaea*.

2. Comparar el efecto de los adyuvantes sobre el órgano diana, el pulmón, mediante el estudio “in vivo” de la función respiratoria y de la histología pulmonar en los diferentes grupos de ratones.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se diseñaron diferentes modelos experimentales murinos en los que se utilizaron ratones BALB/c, distribuidos de forma homogénea, en los diferentes grupos experimentales.

1. Diseño experimental para el estudio de la respuesta inmune primaria a la co-administración de *Olea europaea* y adyuvantes: Se establecieron cuatro grupos de inmunización activa, que recibieron extracto de *O. europaea* con diferentes adyuvantes (hidróxido de aluminio, fosfato cálcico, MPL e ISS), y dos grupos control, al primero se le administró polen de olivo sin adyuvante, y el segundo, el grupo basal, sólo recibió suero salino. Posteriormente se provocó una respuesta inflamatoria en las vías respiratorias, mediante la exposición por vía intranasal al alérgeno (polen de olivo).

2. Modelo experimental de inflamación bronquial alérgica por sensibilización a polen de *O. europaea*: Se dividió a los ratones en dos grupos, en el primero de ellos, los ratones fueron sensibilizados a polen de *O. europaea* mediante la administración de olea adsorbida en hidróxido de aluminio. En el segundo, el grupo control, los ratones recibieron suero salino. Posteriormente, los ratones sensibilizados fueron expuestos al alérgeno mediante la instilación intranasal de polen de *O. europaea* para provocar una respuesta inflamatoria de la vía aérea.

3. Diseño experimental para el estudio de la respuesta inmune secundaria a la co-administración de olea con adyuvantes en ratones sensibilizados a polen de *O. europaea*

Para el estudio de la respuesta inmune secundaria, los ratones fueron sensibilizados a polen de *O. europaea*, excepto el grupo control. El grupo de ratones sensibilizados se dividió en 5 grupos homogéneos, y a cada uno se le asignó un tratamiento. Todos ellos recibieron olea y un adyuvante (hidróxido de aluminio, fosfato cálcico, MPL e ISS), excepto un grupo que recibió olea sin adyuvante. Posteriormente, los ratones fueron expuestos al alérgeno por vía intranasal, con el fin de desarrollar una respuesta inflamatoria a nivel de las vías respiratorias.

Se realizaron extracciones sanguíneas, antes y después de las intervenciones terapéuticas, para determinación de inmunoglobulinas séricas; pruebas de hiperreactividad bronquial inespecífica, mediante pletismografía corporal total; extracción del bazo y cultivo de esplenocitos para cuantificación de citocinas y extracción del lóbulo pulmonar inferior derecho, para estudio anatomopatológico pulmonar.

## RESULTADOS

1. Efecto de la administración de adyuvantes asociados a polen de *Olea europaea* en ratones sanos.

La IgG1 específica a polen de olivo producida por los ratones sanos que recibieron olea y aluminio fue significativamente mayor que la IgG1 producida por aquellos que fueron tratados con olea e ISS como adyuvante, olea sin adyuvante o los controles que recibieron únicamente suero salino.

En cuanto a la producción de IgG2a, ésta fue significativamente mayor en los grupos de ratones tratados con olea y MPL o ISS como adyuvantes.

2. Efecto sistémico de la administración de un alérgeno, polen de *Olea europaea*, asociado a hidróxido de aluminio.

El grupo de ratones que recibió olea e hidróxido de aluminio, produjo una cantidad de IgG1 y presentó una hiperreactividad bronquial significativamente mayor que los controles. Estos resultados demuestran la sensibilización a los ratones a polen de olivo, y el desarrollo de un modelo murino de inflamación bronquial alérgica.

### 3. Efecto de la administración de adyuvantes asociados a un alérgeno en ratones sensibilizados a polen de *Olea europaea*

- La inmunización potenció la producción de IgG1 específica a olivo en todos los grupos de ratones sensibilizados a polen de olivo, independientemente del tratamiento recibido. En cambio, la IgE producida por los ratones que recibieron olea e hidróxido de aluminio fue mayor que en el resto de grupos, y la cantidad de IgE secretada por los ratones tratados con olea más ISS y MPL fue significativamente menor. Los ratones tratados con olea e ISS produjeron una respuesta de IgG2a específica mucho mayor que el resto de grupos, siendo, por tanto, el adyuvante que más potenció la actividad humoral Th1.
- En la respuesta inmune celular, los ratones tratados con olea e ISS produjeron unos niveles de IFN- $\gamma$  significativamente mayores que el resto de los grupos del estudio. El grupo de ratones tratados con MPL produjo una cantidad de IFN- $\gamma$ , significativamente mayor que el grupo tratado con olea e hidróxido de aluminio y que el grupo control de ratones alérgicos.
- En el estudio de función pulmonar, los ratones tratados con derivados bacterianos (MPL e ISS) fueron los únicos capaces de presentar una mejora significativa en la hiperreactividad bronquial.
- En el estudio histológico, los ratones sensibilizados a polen de *O. europaea*, que no recibieron tratamiento con ningún adyuvante presentaron una cantidad de infiltrados inflamatorios significativamente mayor que los que recibieron tratamiento con olea y MPL o ISS.

## CONCLUSIONES:

En el modelo animal:

1. El uso de adyuvantes asociados al alérgeno en inmunoterapia específica es relevante para su efecto sobre las enfermedades alérgicas. Los adyuvantes que potencian la respuesta inmune, mejoran la eficacia clínica.
2. La co-administración de adyuvantes con polen de *Olea europaea* en ratones sanos BALB/c tiene propiedades inmunomoduladoras. El hidróxido de aluminio induce una respuesta humoral Th2, mientras que la co-administración de un adyuvante derivado bacteriano (MPL o ISS) con olea provoca una respuesta humoral Th1.
3. En ratones sensibilizados a polen de *O. europaea*, el uso de derivados bacterianos (MPL e ISS) como adyuvantes de inmunoterapia redirige la respuesta inmune hacia la vía Th1.
4. La inmunoterapia con hidróxido de aluminio induce una potente respuesta humoral de tipo Th2 en ratones sensibilizados a polen de olivo. Los derivados bacterianos (MPL e ISS) no son capaces de suprimir completamente la respuesta humoral Th2, pero sí la reducen significativamente.
5. El empleo de inmunoterapia específica con olea y adyuvantes que contienen derivados bacterianos en su composición (MPL e ISS) en ratones sensibilizados a polen de *O. europaea* disminuyen la hiperreactividad bronquial y la inflamación pulmonar alérgica.
6. Los efectos de los adyuvantes MPL e ISS en la inmunoterapia específica en ratones sensibilizados a polen de *O. europaea* parecen ser más beneficiosos que los aportados por hidróxido de aluminio y fosfato cálcico.

## SUMMARY

## **SUMMARY:**

### **INTRODUCTION**

Allergen-specific immunotherapy (ITE) involves the administration of gradually increasing quantities of the patient's relevant allergens until a dose is reached that is effective in improving the symptoms caused by subsequent exposure to the offending allergen. ITE induces clinical and immunological tolerance, has long-term efficacy, prevents progression of the disease and improves the quality of life of allergic patients.

Adjuvants are substances that are given along with the antigenic protein in vaccines. Its function is to promote, through different mechanisms, the therapeutic effect of the allergen with which it is co-administered. So, the fundamental property of an adjuvant is to increase the immunogenicity of the extract. To achieve this it should enhance the induction of specific T-cells to produce IL-10 and raise the Th1 cytokines profile.

Currently, aluminum hydroxide is the most widely used adjuvant in ITE. Approximately 75% of the formulations for subcutaneous immunotherapy include aluminum, having proved its efficacy and good safety profile. The main function of the aluminum adjuvant is to provide a depot effect, i.e. to obtain a delayed allergens release from the administration site.

Moreover, aluminum is often used in murine models for inducing allergic inflammation, given its ability to induce a Th2 response when administered sc associated with antigen. This is an undesirable effect of the aluminum when used as adjuvant in ITE.

Aluminum is considered a safe adjuvant. However, its use as an adjuvant contributes directly (and significantly) to the aluminum body burden. As aluminium is relatively insoluble it forms localized deposits in the injection site, that result in adverse effects (most often moderate-severe granulomas). It may also be transported to other organs such as lymph nodes or brain, where the aluminum can produce toxic effects. The inflammation and oxidative stress caused by the aluminum has been implicated in human neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease. In addition, the increasing



incidence of autism has been linked to the amount of vaccines with aluminum received in infancy.

Calcium phosphate is another adjuvant used for years to induce physical modification in allergens, resulting in a depot effect, decreasing the incidence of side effects, while providing sufficient immunogenicity to the extract achieving a significant clinical effect. Calcium phosphate is a normal constituent of the human body, so it is well tolerated and easily absorbed. It is usually considered very safe and is used occasionally as an alternative to aluminum, as it does not produce subcutaneous nodules, though others authors describe local inflammatory reactions.

Furthermore, there are others adjuvants whose mode of action is through an activation of the innate immune system by using pathogens. This action is based on the agonistic effects of these adjuvants on the *toll-like* receptors (TLRs), found on the surface of dendritic cells, neutrophils, macrophages and natural killer cells (NK cells) from the innate immune system. Different signaling pathways are triggered depending on which type of TLRs are activated, providing the possibility to control the Th2 cytokine overexpression or to promote a shift in Th1/Th2 balance toward Th1-dominant immunity.

Monophosphoryl Lipid A (MPL) is one of those immunostimulatory adjuvants, and has been approved in recent years for specific immunotherapy. MPL is a detoxified lipopolysaccharide (LPS) produced by a strain of *Salmonella minnesota* R595. The mechanism of action of MPL as an adjuvant lies in its partial TLR4-agonist activity.

Immunostimulatory DNA sequences (ISS) is another adjuvant known for its immunostimulatory properties. An unmethylated cytosine-guanine dinucleotide (CpG) is the sequence motif responsible for this property, and is present in abundance in bacterial genomes but rare in vertebrate (mammalian) genomes. These unmethylated CpG sequences act as ligands for TLR9.

Briefly, aluminum salts have been traditionally used as adjuvant for conventional s.c. ITE, though paradoxically employed as an inducer for Th2 immune responses in

experimental animal models. Identifying alternative adjuvants able to induce regulatory T cells and Th1 immune response would improve the ITE effectiveness as treatment for asthma and other allergic diseases. There are insufficient studies comparing the efficacy and mechanism of action of these adjuvants.

On this basis, a study was proposed to compare the effectiveness of each of these adjuvants, focusing on an immunological point of view, on lung function and on lung histology.

## OBJECTIVES

The main objective of this project is to compare the immunological and clinical efficacy of different adjuvants of specific immunotherapy for allergic diseases in a murine experimental model.

The specific objectives proposed are:

1. Compare the *in vitro* immunological effect of several adjuvants used in immunotherapy for allergic diseases, measuring specific immunoglobulins and their impact on the cytokine profile:
  - 1.1. Comparative study of the primary immune response induced by adjuvants in healthy mice.
  - 1.2. Comparative study of secondary immune response induced by adjuvants in a model of allergic airway inflammation by *Olea europaea* pollen sensitization.
2. Compare the adjuvants effect on the lung as the target organ, through an "in vivo" study of the different mice groups, with pulmonary function testing and lung histology.

## MATERIALS AND METHODS

BALB/c mice were homogeneously distributed in different experimental groups of the designed murine models.

1. Experimental design for the study of the primary immune response to *Olea europaea* and adjuvants co-administration: four groups were established for active immunization, and received *O. europaea* extract with different adjuvants (aluminum hydroxide, calcium phosphate, MPL and ISS), and two control groups, the first one received olive pollen without adjuvant, and the second only saline (considered the baseline group). Later, an inflammatory airway response caused by intranasal exposure to the allergen (olive pollen) was provoked.

2. Experimental model of *O. europaea* pollen-induced airway inflammation: The mice were divided into two groups, in the first group, mice were sensitized by subcutaneous injection with *O. europaea* pollen adsorbed to aluminum hydroxid. In the second one (control group), mice received saline. Then, the sensitized mice were exposed to the allergen by intranasal instillation of *O. europaea* pollen to induce an inflammatory airway response.

3. Experimental design for the study of the secondary immune response to *O. europaea* pollen and adjuvants co-administration in sensitized mice:

To study the secondary immune response, mice were sensitized to *O. europaea* pollen, except the control group. The sensitized mice were divided into 5 homogeneous groups, each one of them assigned to a different treatment. All the groups received olea and an adjuvant (aluminum hydroxide, calcium phosphate, MPL and ISS), except for a group that received olea with no adjuvant. Then, mice were exposed intranasally to the allergen, in order to develop an inflammatory response in the respiratory tract.

Blood samples were taken before and after therapeutic interventions, measuring serum immunoglobulins; nonspecific bronchial hyperreactivity testing by whole body plethysmography was carried out; and splenectomy with culture of splenocytes for

quantitation of cytokines and removal of the right lower lobe, (for lung histology) was performed.

## RESULTS

1. Effect of the administration of adjuvants associated with *Olea europaea* pollen in healthy mice.

The specific IgG1 to olive pollen produced by healthy mice receiving olea and aluminum was significantly higher than the IgG1 produced by those who were treated with olea and ISS as adjuvant, olea without adjuvant or controls that only received saline. As for the IgG2a production, this was significantly greater in the mice groups treated with olea and ISS or MPL as adjuvants.

2. Systemic effect of an allergen (*Olea europaea* pollen) and aluminum hydroxide administration.

The mice group that received olea and aluminum hydroxide produced significantly higher values of IgG1 and bronchial hyperreactivity than controls. These results demonstrate the sensitization of mice with olive pollen, so, the development of a murine model of allergic airway inflammation.

3. Effect of administration of adjuvants associated with an allergen in sensitized mice to *Olea europaea* pollen

- Immunization enhanced the production of olive specific IgG1 in all groups of mice sensitized to olive pollen, regardless of treatment received. In contrast, IgE produced by mice receiving olea and aluminum hydroxide was higher than in the other groups, and the amount of IgE secreted by mice treated with olea and ISS or MPL was significantly lower. Mice treated with olea and ISS produced a much higher specific

IgG2a response than the other groups, therefore being the adjuvant that enhanced most the Th1 humoral activity.

- In the cellular immune response, mice treated with olea and ISS produced significantly higher levels of IFN- $\gamma$  than the rest of the study groups. The mice group treated with MPL produced an amount of IFN- $\gamma$  significantly higher than the group treated with olea and aluminum hydroxide and than the control group of allergic mice.

- In the lung function study, mice treated with bacterial derivatives (MPL and ISS) were the only ones able to present a significant improvement in bronchial hyperresponsiveness.

- In the histological study, sensitized mice to *O. europaea* pollen who received therapy with no adjuvant presented significantly more inflammatory infiltrates than those receiving treatment with olea and MPL or ISS.

## CONCLUSIONS:

In the animal model:

1. The use of adjuvant associated with allergen specific immunotherapy is relevant for its effect on allergic diseases. Adjuvants that enhance the immune response improve clinical efficacy.

2. Adjuvants and *Olea europaea* pollen co-administration in healthy BALB/c mice has immunomodulatory properties. Aluminum hydroxide induces a humoral Th2 response, whereas co-administration of a bacterial derived adjuvant (MPL or ISS) with olea causes a humoral Th1 response.

3. In *O. europaea* pollen-sensitized mice, the use of bacterial products (MPL and ISS) as adjuvants in immunotherapy redirects the immune response towards the Th1 pathway.

4. The immunotherapy with aluminum hydroxide induces potent humoral Th2-type response in olive-pollen sensitized mice. Bacterial products (MPL and ISS) are not able to completely suppress the humoral Th2 response, but they reduce it significantly.
5. The use of specific immunotherapy with olea and bacterial-derived adjuvants (MPL and ISS) in *O. europaea* pollen-sensitized mice reduce airway hyperresponsiveness and allergic pulmonary inflammation.
6. The effects of MPL and ISS adjuvants in specific immunotherapy in *O. europaea* pollen-sensitized mice appear to be more beneficial than those provided by aluminum hydroxide and calcium phosphate.

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. ENFERMEDADES ALÉRGICAS: CONCEPTO Y FISIOPATOLOGIA**

La alergia es una respuesta desproporcionada del sistema inmunológico, en la se reconoce como extraña una sustancia que es inocua en la mayoría de la población, dando lugar a una serie de manifestaciones clínicas características de las enfermedades alérgicas.

En un individuo sano, la respuesta normal a un alérgeno es la ausencia de respuesta, o una respuesta inmune cuyo resultado es un estado de tolerancia inmunológica específica. Este estado se caracteriza por una estricta regulación de la respuesta inmune, cuyo objetivo es proteger al huésped de señales exageradas que podrían causar daño tisular. Este equilibrio en la regulación de la respuesta inmune, puede alterarse por determinados factores, ambientales o genéticos, dando lugar a diversas enfermedades alérgicas y/o autoinmunes (1-2)

El mecanismo de hipersensibilidad tipo I de las enfermedades alérgicas consta de dos fases. Una inicial en la que tiene lugar la sensibilización y el desarrollo de células de memoria, y una tardía, caracterizada por la inflamación y daño tisular provocados por las células efectoras. Durante la fase de sensibilización se produce la diferenciación y expansión clonal de los linfocitos Th2, que secretan citocinas capaces de inducir en los linfocitos B el cambio de isotipo de Inmunoglobulina, y así la producción de IgE específica frente al alérgeno que inició la reacción. Esta IgE se une a los receptores de alta afinidad para la IgE (FcεRI) de la superficie celular de mastocitos y basófilos. Ante nuevas exposiciones al alérgeno, éste se une de forma específica a la IgE de superficie celular, dando lugar a la activación y liberación de mediadores de la inflamación por parte de mastocitos y basófilos. Estos mediadores causan vasodilatación con aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, agregación de plaquetas, infiltrado inflamatorio de eosinófilos, aumento de la secreción de moco y estímulo de los nervios sensitivos.



## 1.1 PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA

Tras la exposición al alérgeno en individuos susceptibles, las células presentadoras de antígeno (APCs) procesan el alérgeno y lo exponen en la superficie celular.

Las células dendríticas son las principales APCs. Estas células son el pilar fundamental para la activación del sistema inmune innato y adaptativo, ambos necesarios para defender al huésped de estímulos dañinos.

Las células dendríticas están presentes en los tejidos periféricos expuestos al medio exterior, como la piel o el epitelio pulmonar o intestinal, donde forman un entramado celular con función centinela. Cuando las células dendríticas son expuestas a un antígeno se produce una migración de estas células desde la periferia hacia el área de linfocitos T de los ganglios linfáticos regionales. Esto conlleva un proceso de maduración de las células dendríticas, que incluye cambios sustanciales en las moléculas de adhesión y en las moléculas coestimuladoras para linfocitos T vírgenes (3).

Las células dendríticas procesan el alérgeno en pequeños péptidos y lo presentan a los linfocitos T vírgenes a través de la unión de los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) con los receptores de linfocitos T. Es necesaria la presencia de señales coestimuladoras en las células dendríticas, como CD80/CD86/CD28 y su interacción con D40-CD40L, OX40-OX40L e ICOS-ICOSL de los linfocitos (2). Esta unión da lugar a la diferenciación de linfocitos T vírgenes en T cooperadores (Th). El tipo de respuesta de linfocitos Th depende de la naturaleza del antígeno presentado, así, algunos linfocitos Th son transportados a los folículos de linfocitos B para intervenir en el cambio de isotipo de Ig y otras hacia el lugar de la infección como parte de la inmunidad innata para eliminar a los patógenos.

La tolerancia inmunológica es el resultado de una disminución en la captura de antígenos por las células dendríticas de la mucosa, consecuencia de una exposición repetida a antígenos inocuos. La alergenicidad de un antígeno se basa en la capacidad de evitar el estado de tolerancia inmunológica. Esto ocurre por diferentes

mecanismos, como la activación de los receptores TLR de las células dendríticas, de la actividad proteolítica y la acción directa de los alérgenos sobre las células epiteliales, para facilitar su propio paso a través de la barrera epitelial (4).

## 1.2 RESPUESTA DE LINFOCITOS T

En los pacientes con enfermedades alérgicas, los linfocitos Th2 predominan sobre el resto de clones de linfocitos T. La tolerancia periférica de linfocitos T se desarrolla en los órganos linfoides periféricos, mediante mecanismos intrínsecos y extrínsecos a las linfocitos T. Entre los mecanismos extrínsecos se encuentran los linfocitos Treg, citocinas supresoras (como IL-10 y TGF- $\beta$ ), y las APCs. Los mecanismos intrínsecos comprenden la anergia de linfocitos T, alteración de fenotipo de linfocitos T y apoptosis. La diferenciación de clones de linfocitos T a linfocitos Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 y Treg es un proceso complejo (figura 1).

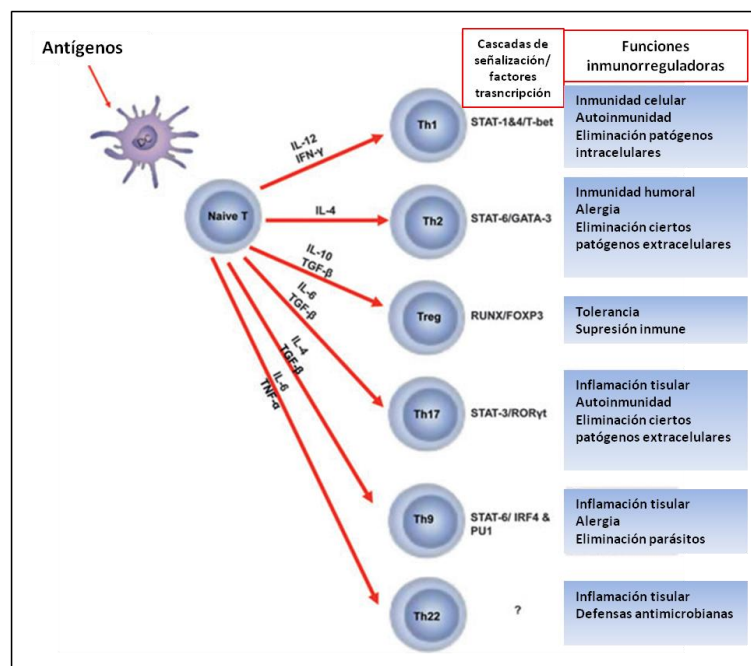


Figura 1. La diferenciación de linfocitos T en líneas celulares T CD4+ efectoras Th1, Th2, Th17 y en linfocitos Treg es estimulada por la presentación del antígeno por la célula dendrítica a las linfocitos T vírgenes. Ciertas citocinas y otros cofactores liberados por las células dendríticas y otras células, inducen la diferenciación de linfocitos T vírgenes, lo que implica la activación de cascadas de señalización y factores de transcripción. Cada subgrupo de linfocitos T posee funciones reguladoras propias en el sistema inmune. Modificado de Soyer y cols (2).

### LINFOCITOS T COOPERADORES TIPO 1 Y TIPO 2

La diferenciación de linfocitos T al fenotipo Th1 es inducida por la IL-12 y el IFN- $\gamma$  secretados por las células dendríticas, que dan lugar a la activación de transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT), STAT1 y STAT4. STAT1 estimula la expresión de T-bet, principal factor de transcripción de la diferenciación de Th1. T-bet y RUNX3 actúan en conjunto para inducir la producción de IFN- $\gamma$ , disminuir la expresión de IL-4 en los linfocitos Th1 e inhibir GATA3.

GATA3 es el principal factor de transcripción de los linfocitos Th2 e interviene, junto con STAT5, en la producción temprana y tardía de IL-4. La unión de IL-4R con GATA3 es necesaria para la activación de IL-4, que, a su vez, activa los linfocitos Th2 a través de STAT6. La IL-4 inhibe la respuesta Th1 mediante la inhibición de T-bet y mediante la supresión de la respuesta de Th1 a IL-12 e IFN- $\gamma$ . Además, la IL-4 inducida por GATA3 se une al promotor de FOXP3 para inhibir la expresión de FOXP3 en los linfocitos Treg. GATA3 también es necesario para la producción de IL-5 e IL-13 por linfocitos Th2 maduras (2).

Otros mecanismos de regulación incluyen alteraciones en la anergia de linfocitos T. TIM1 (proteína con dominio de mucina y dominio de inmunoglobulina del linfocito T) es una potente señal coestimuladora de la proliferación de linfocitos T vírgenes y producción de citocinas. Los linfocitos Th2 de los pacientes con enfermedades alérgicas expresan TIM1. TIM4 es el ligando natural de TIM1. La inmunoterapia específica (ITE) suprime la desviación de la respuesta hacia Th2 evitando la interacción de TIM1/TIM4 en los linfocitos Th2 específicas frente al antígeno (5).

Algunas citocinas son responsables del inicio de la respuesta inflamatoria alérgica. La TLSP (linfopoyetina del estroma tímico) es producida por las células epiteliales y células dendríticas, principalmente cutáneas y pulmonares, y aumenta la capacidad que poseen las células dendríticas 11c+ de estimular a los linfocitos T. Las células dendríticas 11c+ producen las quimiocinas CCL17 y CCL22, ambas con capacidad para atraer linfocitos Th2 después de su exposición a TLSP. Estos linfocitos Th2 están preparadas para generar IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- $\alpha$ , además de disminuir IL-10 e IFN- $\gamma$ .

Las células dendríticas activadas por TLSP expresan OX40L, que estimula la diferenciación de los linfocitos Th hacia células inflamatorias Th2. TLSP inhibe la generación de linfocitos Treg inducibles e interfiere la tolerancia inmunológica de la vía aérea. El número de células epiteliales y de submucosa que expresan TLSP en pacientes con asma bronquial es mayor que en individuos sanos (6).

### LINFOCITOS T REGULADORES

Los linfocitos T reguladores (Treg) son esenciales en la supresión de la inflamación mediada por Th2 y en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Los linfocitos Treg CD4<sup>+</sup> se clasifican en dos categorías (fig. 2): Treg naturales (nTreg) y Treg inducidos (iTreg). La diferenciación a linfocitos nTreg tiene lugar durante el proceso habitual de maduración de los linfocitos T en el timo, y se caracteriza porque expresan niveles elevados de CD25 y del factor de transcripción Foxp3. Los linfocitos iTreg adquieren su capacidad supresora debido a la activación periférica de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes, tras su encuentro con el antígeno, bajo condiciones estimuladoras específicas, dando lugar a linfocitos Tr1 secretores de IL-10 y a linfocitos Th3 productores de TGF- $\beta$ .

Otros tipos de linfocitos Treg Foxp3<sup>+</sup> identificados en humanos son aquellos que producen IL-17 y los que son inducidos *ex vivo* desde linfocitos TCD4<sup>+</sup> naive por TGF- $\beta$  con otros factores. En resumen, los linfocitos Foxp3<sup>+</sup> involucrados en la tolerancia a alérgenos en humanos, probablemente estén compuestas de una combinación entre los nTreg y aquellos inducidos en la periferia (7).

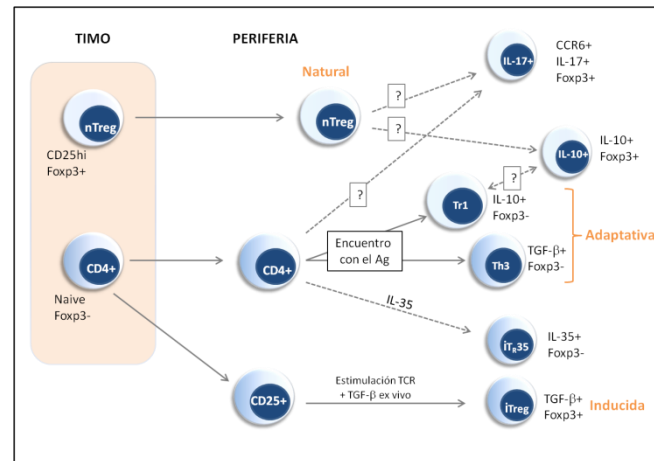


Figura 2. Tipos de linfocitos Treg implicadas en la supresión de la respuesta inflamatoria. Las líneas discontinuas indican aspectos no resueltos de las Treg humanas. Modificado de Wisniewski y cols (7).

En individuos sanos la respuesta inmune a alérgenos puede ser considerada como una ausencia de respuesta de los linfocitos T o la inducción de tolerancia periférica activa por parte de los diferentes tipos de linfocitos Treg. Cuando un individuo sano es estimulado con un alérgeno, los niveles de IL-10 y TGF-β en células mononucleares de sangre periférica aumentan, dando lugar a la supresión activa de la respuesta específica de linfocitos T, que está mediada por linfocitos Tr1 o linfocitos Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Estos dos tipos celulares suprimen la IgE específica e inducen IgG4 en cultivos de células mononucleares de sangre periférica humana. Los linfocitos nTreg expresan gran cantidad CTLA-4, una proteína que forma parte de la familia CD28, que se une a CD80/86, al igual que CD28, pero con mayor afinidad. CTLA-4, al contrario que CD28, disminuye la activación de linfocitos T. Los linfocitos nTreg Foxp3<sup>+</sup> limitan la inflamación neutrofílica de la vía aérea mediada por linfocitos Th17.

Los linfocitos Treg también previenen la inflamación alérgica a través de la acción sobre mastocitos, basófilos y eosinófilos, y desempeñan un papel importante en el remodelado de tejidos, ya que interfieren con las células del tejido conectivo. Los linfocitos Treg suprimen la degranulación de mastocitos dependiente de FcεRI, mediante el contacto célula-célula, que requiere la interacción de OX40-OX40L, e inhibe la entrada de calcio en el mastocito y la producción de cAMP.

Las células dendríticas son el principal objetivo de la tolerancia inmunológica mediada por linfocitos Treg. Los linfocitos Treg forman agregados alrededor de las DCs para disminuir la expresión de CD80/86 sobre las mismas, de forma dependiente de CTLA-4 y LFA-1. Los linfocitos Treg también inhiben la maduración de células dendríticas y la activación de linfocitos T vírgenes dependientes de antígeno. En individuos sanos, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y los linfocitos nTreg inducen las células dendríticas tolerogénicas a través de una vía dependiente de IL-10, mientras que en pacientes asmáticos la inducción de células dendríticas tolerogénicas por los linfocitos Treg es mucho menos eficiente, y esto se correlaciona con la gravedad del asma (2).

#### LINFOCITOS T COOPERADORES TIPOS 17, 9 y 22:

Los linfocitos Th17 se caracterizan por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-6 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Estas células tienen una función predominantemente inflamatoria en el asma bronquial. La IL-17 potencia la atracción de neutrófilos en el lugar de la inflamación en la vía aérea y aumenta la producción de IL-6 e IL-8, factores activadores de neutrófilos, por los fibroblastos humanos. El balance entre eosinofilia y neutrofilia parece estar determinado por el balance entre IL-4 e IL-17, de forma que la infiltración por neutrófilos inducida por linfocitos Th17 se relaciona de forma inversa con el reclutamiento de eosinófilos mediado por linfocitos Th2. La concentración de IL-17 en plasma y el porcentaje de linfocitos Th17 se correlaciona con la gravedad del asma (8).

En los últimos años se ha identificado un subgrupo de linfocitos Th, conocido como Th9, que se caracteriza por una producción de citocinas con predominio de IL-9. En un modelo murino, la transferencia de linfocitos Th9 dio lugar a síntomas graves de asma, aumento de hiperreactividad bronquial y aumento de células caliciformes y eosinófilos en el lavado broncoalveolar (9).

Los linfocitos Th22 se caracterizan por una la secreción de IL-22, miembro de la familia de citocinas IL-10. La IL-22 puede funcionar como proinflamatoria o antiinflamatoria,

actuando principalmente sobre células no inmunológicas de la piel, tracto digestivo, pulmón o riñón. Los linfocitos Th22 también son capaces de secretar IL-10 y TNF- $\alpha$  (2).

### **1.3 LINFOCITOS B**

En la respuesta inmune alérgica los linfocitos Th2 producen citocinas, como IL-4 e IL-13, que intervienen en el cambio de isotipo de IgM a IgE en los linfocitos B. Además, son necesarias señales coestimuladoras, como CD-40-CD40L y CD28-CD80/86 para la interacción de linfocitos Th con linfocitos B.

La unión de IgE con su Fc $\epsilon$ RI de mastocitos o basófilos da lugar a la liberación de compuestos biológicamente activos, como histamina, mediadores derivados de lípidos, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento asociados con la respuesta alérgica inmediata. La unión de IgE con Fc $\epsilon$ RI de células dendríticas y monocitos, y con Fc $\epsilon$ RII de linfocitos B potencia la captación de antígeno por las APCs, que presentan los epítopos de los alérgenos a los linfocitos T CD4+. En individuos sanos la respuesta al alérgeno da lugar a la producción de IgG4, IgG1 e IgA en cantidades bajas o relativamente elevadas, con una respuesta de IgE específica ausente o muy débil. En humanos, un nivel elevado de IgG4 es un marcador de tolerancia inmunológica y se asocia con mejoría de síntomas de la enfermedad alérgica.

### **1.4 CELULAS EFECTORAS DE LA RESPUESTA ALÉRGICA**

#### **EOSINÓFILOS**

En las últimas dos décadas, nuestro conocimiento sobre los eosinófilos ha evolucionado, desde su consideración como unas células exclusivamente efectoras destructivas, hasta demostrar efectos pleiotrópicos y su participación activa en la modulación inmune y en la reparación de tejidos (10).

Las propiedades biológicas de los eosinófilos incluyen la liberación de proteínas tóxicas de sus gránulos: proteína básica principal (MBP), proteína catiónica del eosinófilo (ECP), neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) y peroxidasa del eosinófilo (EPO); radicales libres de oxígeno, eicosanoides, citocinas Th2, y factores de crecimiento. Estos productos causan daño local y contraen el músculo liso bronquial y aumentan la permeabilidad vascular y la producción de moco.

Los eosinófilos son la célula predominante en el proceso inflamatorio crónico de la fase tardía de la respuesta alérgica y son el sello de la inflamación alérgica de las vías aéreas. La presencia de eosinófilos en la mucosa de las vías respiratorias es debido a la infiltración *de novo* de células maduras de la circulación, dependiente de IL-5. En la mayoría de los fenotipos de asma, hay un aumento en los eosinófilos en los tejidos, la sangre y la médula ósea y, en general, sus cifras se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. Los eosinófilos, en el paciente asmático, también desempeñan un papel inmunomodulador, pudiendo liberar citocinas tales como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, así como IL-12 e IFN- $\gamma$  y quimiocinas como CXCL10 y CCL5. Curiosamente, los eosinófilos también pueden liberar IL-10 y TGF- $\beta$ 1, lo que sugiere que también tienen un papel regulador (11).

### BASÓFILOS

Los basófilos están implicados en múltiples enfermedades, entre las que se encuentran el asma y las enfermedades alérgicas. El desarrollo y las funciones de los basófilos son heterogéneos, existiendo al menos dos tipos de poblaciones de basófilos: los inducidos por IL-13 (IgE dependientes) y los inducidos por TLSP (IgE independientes). Los basófilos activados por IgE liberan mediadores fundamentales en la inflamación presente en el asma bronquial, como histamina y LTC4. La señalización dependiente de TLSP interviene en la reestructuración de la vía aérea, estimulando a los fibroblastos pulmonares (12).



### MASTOCITOS

Los mastocitos secretan muchas citocinas y proteasas que pueden orquestar el desarrollo de la inflamación crónica de las vías respiratorias (IL-4, IL-5 e IL-13), proteasas neutras, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), triptasa y quimasa. Las dos últimas juegan un papel importante en la reestructuración de la vía aérea. Los mastocitos también sintetizan y liberan eicosanoides, histamina, PGD2 y LTC4. La liberación de estos mediadores produce broncoconstricción, secreción de moco, y edema de la mucosa.

### MACRÓFAGOS

Los macrófagos alveolares son las células más numerosas en el lumen de vías respiratorias en sujetos normales y en la mayoría de los pacientes con asma. Tienen la capacidad de producir y secretar muchas citocinas proinflamatorias (MIP-1 $\alpha$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ , CXCL8) y antiinflamatorias (IL-10 e IL-12), quimiocinas (eotaxina y CCL5), eicosanoides (prostaglandinas y LTB4), factor activador de plaquetas (PAF), así como radicales de oxígeno, desempeñando un papel importante en la patobiología de la inflamación crónica del asma. El estado de activación de los macrófagos alveolares se correlaciona con la gravedad del asma.

### NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos intervienen en la patogénesis del asma a través de la producción de mediadores proinflamatorios y por la activación inmune innata. Estas células expresan Fc $\epsilon$ RI, lo cual sugiere que pueden jugar un papel en la inflamación alérgica. Su número se incrementa en las vías respiratorias durante la fase tardía de la respuesta alérgica y se encuentran en un estado de activación permanente en las vías respiratorias de determinados pacientes asmáticos, especialmente en el asma grave. Sin embargo, su papel exacto en el asma bronquial sigue siendo poco claro (13).

### FIBROBLASTOS Y MIOFIBROBLASTOS

Los fibroblastos se encuentran en el tejido conectivo y son los responsables de la producción de colágeno, reticulina y elastina, así como de la síntesis de proteoglicanos y glicoproteínas de la matriz intercelular. Los fibroblastos del pulmón pueden comportarse como células inflamatorias tras la activación por la IL-4 e IL-13.

Los miofibroblastos contribuyen a la regulación de la inflamación bronquial a través de la liberación de citocinas y a la remodelación del tejido secretando componentes de matriz extracelular (ECM), tales como elastina, fibronectina y laminina (14).

## **2. ASMA BRONQUIAL**

El asma bronquial es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, en cuya patogenia intervienen diversas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos, y que cursa con hiperrespuesta bronquial y una obstrucción variable al flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea por la acción medicamentosa o espontáneamente (15).

El asma bronquial alérgico es una enfermedad compleja, de origen multifactorial, en la que uno de los principales factores predisponentes es la atopia. El proceso inflamatorio crónico que se produce en el asma alérgico es el resultado de una respuesta inapropiada del sistema inmune frente a aeroalérgenos, provocada por un mecanismo de hipersensibilidad tipo I.

El asma es un problema mundial que afecta a unos 300 millones de individuos. La prevalencia global del asma se encuentra entre el 1 y el 18% (16-17). A pesar de la existencia de múltiples guías y consensos de diagnóstico y tratamiento, el asma es una enfermedad con elevados índices de mal control: sólo el 5.3% de los pacientes con asma bronquial en países europeos presenta un asma adecuadamente controlado (18). Según la Normativa Europea de Inmunoterapia (19), el coste total del asma se estima en más de 25 billones de euros anuales. Dada la situación actual de crisis

económica y que la sanidad es una de las principales partidas de gasto de todos los países desarrollados, es fundamental la búsqueda de tratamientos más eficientes para las enfermedades más prevalentes.

### **3. INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA CON ALÉRGENOS PARA EL TRATAMIENTO DEL LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS.**

La inmunoterapia específica (ITE) con alérgenos consiste en la administración de cantidades gradualmente crecientes de un extracto alergénico a un sujeto alérgico para mejorar la sintomatología causada por la exposición posterior al alérgeno causante (20). La ITE es el único tratamiento que puede modificar el curso de las enfermedades alérgicas, e impedir el desarrollo de asma en los pacientes con rinitis alérgica (20-21). La ITE con alérgenos induce tolerancia clínica e inmunológica, tiene eficacia a largo plazo, previene la progresión de la enfermedad y mejora la calidad de vida de los pacientes alérgicos. Esta definición está basada en una categoría de evidencia I (22).

#### **3.1 MECANISMO DE ACCION DE LA INMUNOTERAPIA**

El principio básico de la ITE es la inducción de tolerancia inmunológica a través de múltiples mecanismos moleculares y celulares, mediante la administración repetida de dosis crecientes del alérgeno causante de la enfermedad (1). El objetivo del tratamiento es, además, conseguir que los beneficios terapéuticos tengan un efecto duradero una vez suspendido el tratamiento (23).

Durante el tratamiento con ITE con alérgenos se producen una serie de cambios inmunológicos (fig. 3). El primero de ellos es un descenso muy temprano en la degranulación de mastocitos y basófilos. La ITE induce un cambio en la polarización de linfocitos T desde Th2 a Th1. Esto se acompaña de un aumento en la relación de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-12)/Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13). Posteriormente, se generan

linfocitos Treg específicos frente al alérgeno y citocinas como IL-10 y TGF- $\beta$ , que juegan un papel fundamental en la supresión de la respuesta Th1 y Th2. En cuanto a los niveles de IgE específica, durante la ITE se observa una elevación inicial y un descenso tardío de los mismos. Los niveles de IgG4 muestran un aumento relativamente temprano, que es dosis dependiente. En algunos estudios los niveles de IgG1 e IgA también se han visto aumentados. Tras varios meses de tratamiento se observa una disminución significativa de la relación IgE/IgG4 específicas frente al alérgeno (24).

Durante el curso de la ITE también se produce una disminución relativamente tardía del tamaño de las pruebas cutáneas que identifican mecanismos de hipersensibilidad tipo 1. Después de unos meses de tratamiento, en la fase de respuesta tardía, se observa una disminución del número de eosinófilos y mastocitos de los tejidos, así como de la liberación de mediadores (23, 25).

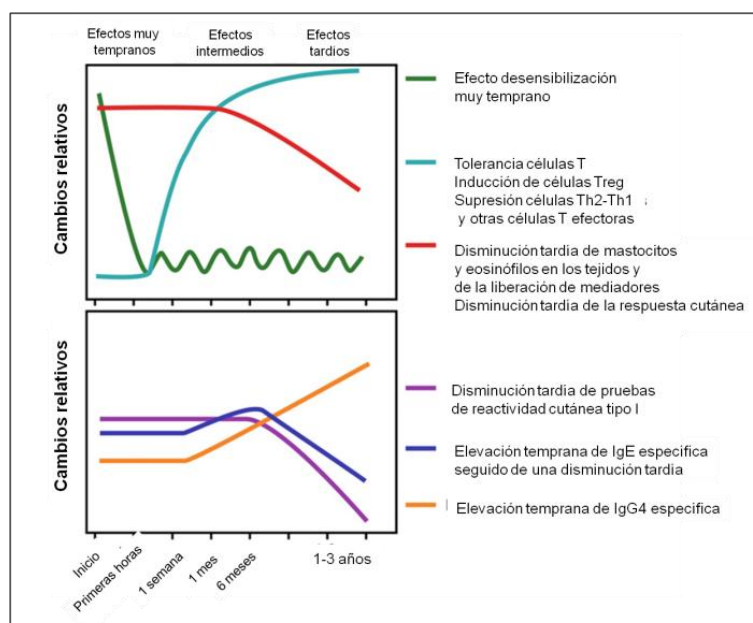


Figura 3. Cambios inmunológicos que tienen lugar durante el curso del tratamiento con Inmunoterapia específica. Modificado de Akdis CA and Akdis M (24).

### **3.1.1 RESPUESTA DE CELULAS T FRENTE A LA INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA**

La exposición repetida de las mucosas de individuos atópicos a dosis bajas de alérgeno da lugar a una respuesta alérgica mediada por IgE. En la inmunoterapia se administran dosis elevadas de alérgeno, por vía subcutánea o sublingual, lo que da lugar a un cambio en la polarización de la respuesta celular de Th2 a Th1. Esto se acompaña de un aumento de la relación de citocinas Th1 frente a Th2 (25). Este cambio en la relación de citocinas puede observarse de forma local, en el órgano diana de la inflamación alérgica (en pulmón, en el caso de asma bronquial).

En los últimos años, la inducción de tolerancia periférica de linfocitos T, se considera el punto clave en el mecanismo de acción de la inmunoterapia. Esta tolerancia periférica se caracteriza por la generación de linfocitos T reguladores específicos frente al alérgeno, que son capaces de producir citocinas antiinflamatorias, como IL-10 y TGF- $\beta$ . Los linfocitos Treg contribuyen al control de la respuesta inmune específica frente al alérgeno mediante: (1) supresión de células presentadoras de antígeno, (2) supresión de linfocitos Th1 y Th2, (3) supresión de IgE específica e inducción de IgG4 e IgA, (4) supresión de mastocitos, basófilos y eosinófilos y (5) interacción con células tisulares y el remodelación de la vía aérea (26).

### **3.1.2 RESPUESTA DE INMUNOGLOBULINAS A LA INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA**

La ITE induce rápidamente tolerancia periférica en los linfocitos T, pero en los linfocitos B no existe evidencia de tolerancia en las primeras fases del tratamiento (27).

La ITE induce un aumento transitorio de los niveles de IgE, seguido de un descenso gradual después de meses o años de tratamiento. La disminución de la IgE sérica no se correlaciona con la mejoría clínica después de la inmunoterapia.

Las subclases de IgG, especialmente IgG4, capturan al alérgeno antes de que alcance la IgE que se encuentra unida a la célula efectora, y así previenen la activación de mastocitos y basófilos. La IgG específica contra el alérgeno se dirige a los mismos

epítopos que la IgE, resultando una competición directa de la unión al alérgeno y un efecto bloqueante. La inmunoterapia específica induce la formación de IgG1 y fundamentalmente IgG4, influyendo así en la actividad bloqueante que ejerce IgG4 sobre la respuesta mediada por IgE. Por otro lado, la correlación entre la mejoría clínica producida por la ITE y la determinación de niveles de IgG sérica es controvertida(28-29).

Es muy posible que la disminución de la relación IgE/IgG4 durante la ITE sea una consecuencia del predominio linfocitos T reguladores sobre Th2. La IL-10 es un potente supresor de la IgE tanto total como específica, mientras que simultáneamente aumenta la producción de IgG4. Por lo tanto, IL-10 no sólo genera tolerancia en linfocitos T, sino que regula la formación de isotipos específicos hacia fenotipos no inflamatorios (24).

En resumen: existe evidencia de que la respuesta Th2 específica frente al alérgeno está regulada por un doble control negativo, la polarización Th1 (mediante IFN- $\gamma$  e IL-12) y el mecanismo inmunosupresor de los linfocitos T reguladores (IL-10 y TGF- $\beta$ ). La Inmunoterapia con dosis elevadas de alérgeno produce el aumento de ambos mecanismos (30) (fig. 4).

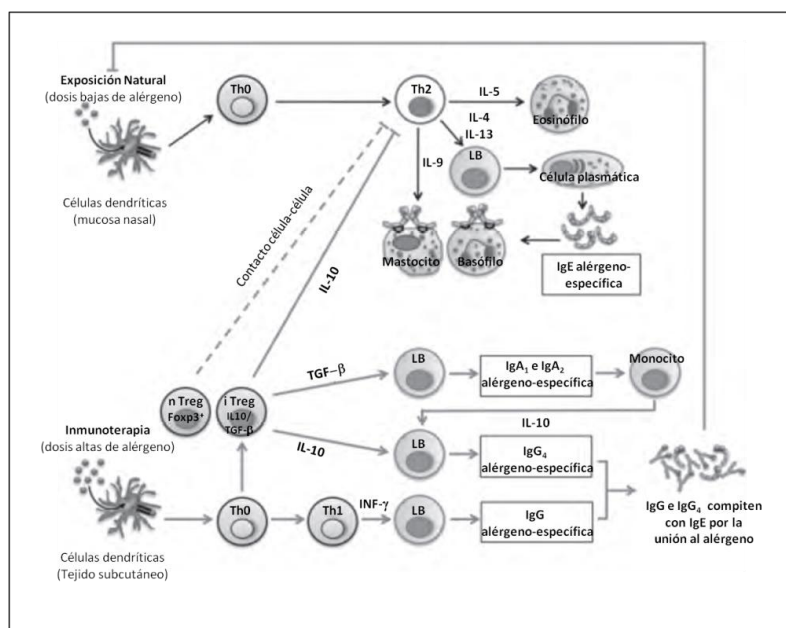


Figura 4. Mecanismo de acción de la inmunoterapia específica (modificado de Eifan y cols (31)).

### **3.1.3 CAMBIOS EN LAS CÉLULAS EFECTORAS**

Tras la administración de ITE existe una rápida disminución del número de mastocitos y basófilos, particularmente cuando se administran dosis crecientes de alérgeno en unas pocas horas (pautas rápidas). El mecanismo de este efecto es aún desconocido, aunque podría ser similar al de las desensibilizaciones rápidas realizadas con fármacos (24). Durante la ITE se liberan mediadores de anafilaxia (histamina y leucotrienos), sin que produzcan una respuesta sistémica, debido a que esta liberación se realiza muy poco a poco, por debajo del umbral de la anafilaxia sistémica. Esto hace que disminuya el contenido de mediadores en los gránulos. De este modo, se produce un proceso de retroalimentación que hace aumentar más aun el umbral de activación de mediadores para desencadenar la misma reacción (32).

La inmunoterapia actúa sobre las células efectoras, tanto en la fase inicial como en la tardía, de forma directa e indirecta, a través de la inhibición de mediadores proinflamatorios.

## **4. ADYUVANTES EN INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA**

Los adyuvantes son sustancias que se administran junto con la proteína antigénica en las vacunas. Su función es potenciar, mediante diferentes mecanismos, el efecto terapéutico del alérgeno con el que es co-administrado. La propiedad fundamental de un adyuvante es, por tanto, el aumento de la inmunogenicidad del extracto. Para ello debe potenciar la inducción de linfocitos T específicos que produzcan IL-10 y aumentar el perfil de citocinas Th1 (33).

### **4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ADYUVANTES UTILIZADOS EN LA INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA**

Los adyuvantes pueden mejorar la respuesta inmune específica a un alérgeno mediante dos mecanismos:

1. Aumentando la captura del alérgeno por las APCs: los adyuvantes son capturados y fagocitados directamente por las APCs, o bien forman un depósito en el lugar de administración que prolonga su exposición, y por tanto su captura por las APCs. En este grupo se incluyen las sales de aluminio, fosfato cálcico, emulsiones y las nuevas partículas farmacéuticas (liposomas, micropartículas y nanopartículas) (34).
2. Activación del sistema inmune innato mediante el uso de patógenos, y posterior puesta en marcha de la respuesta inmune adquirida. Entre estos patógenos encontramos bacterias muertas (micobacterias, *B. abortus*), bacterias vivas (lactobacilos, bifidobacterias) y derivados bacterianos sintéticos (ISS-ODN (CpG), MPL).

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa del organismo, esta respuesta se produce de forma inmediata (en horas) y está mediada por células dendríticas, neutrófilos, macrófagos y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Estas células poseen receptores PRRs (receptores de reconocimiento de patrones) que reconocen un grupo limitado de secuencias conservadas de microorganismos, que se conocen como secuencias PAMPs (patrones moleculares que se asocian a patógenos). Los PAMPs son sustancias compartidas por numerosos patógenos, pero no están presentes en mamíferos. La unión de las PAMPs con sus receptores PRRs da lugar a la activación de vías de señalización que inducen la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de las citocinas involucradas en el establecimiento de la respuesta inmune específica, cuyo objetivo es la eliminación del patógeno (35).

Los primeros PRRs identificados fueron los receptores del tipo Toll (TLRs), de especial interés en el mecanismo de acción de los adyuvantes inmunoestimuladores. Son los homólogos en mamíferos de los receptores Toll de la *D. melanogaster*. Inicialmente se descubrieron en la mosca de la fruta, y posteriormente fueron identificados en mamíferos unos receptores similares, a los que se denominó TLRs.



Los TLR están presentes en una amplia variedad de células: células epiteliales, macrófagos, mastocitos, eosinófilos y células dendríticas. Los TLRs son miembros de la superfamilia de receptores Toll-interleucina 1, que contienen dos importantes dominios, uno externo, responsable de la unión al ligando, compuesta por repeticiones ricas en leucina (LRR) y un dominio citoplasmático similar al del receptor de IL-1 (TIR). Cada TLRs muestra un patrón de expresión, localización intracelular y vía de señalización diferente, dando lugar a respuestas inmunes distintas (36).

Cuando las PAMPs se unen al dominio LRR del TLRs se inician las vías de señalización, mediante la interacción del dominio TIR del TLRs con moléculas adaptadoras, que finalmente dan lugar a la activación de factores nucleares y producción de citocinas proinflamatorias (fig. 5).

Según las moléculas adaptadoras que intervengan, da lugar a diferentes vías de señalización:

- La vía dependiente de MyD88, provoca la activación del NFκB, activación de la proteína 1 y producción de IL-1, IL-6 y TNF-α.
- La vía independiente de MyD88, dependiente de TRIF, que da lugar a la activación del factor de regulación de interferón y producción de IFN-β.

El tipo de mediador inmunológico inducido depende de la clase de microbio y de la localización del TLRs. En lo que respecta a los adyuvantes, la activación de TLR debería desviar la vía dependiente de MyD88 hacia la vía independiente de MyD88 (dependiente de TRIF), lo que indica que la estrategia de los adyuvantes podría ir dirigida hacia modular la vía de activación de TLR que utilizan, por ejemplo un agonista que favorezca la vía TRIF o inhibidores de NFκB (37).

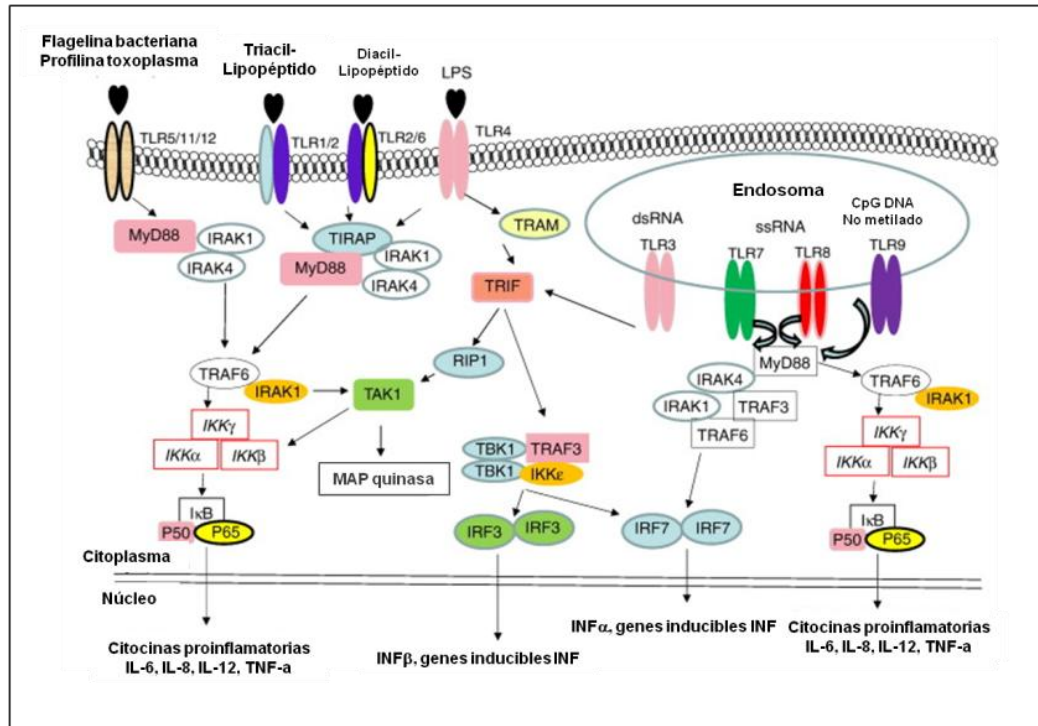


Figura 5. Vías de señalización de los TLRs y moléculas efectoras. Modificado de Chen y cols. (35)

Los TLRs tienen un papel fundamental en el resultado del encuentro de las células dendríticas presentes en la vía aérea con el antígeno. Los patógenos inhalados estimulan los TLRs presentes en células epiteliales y macrófagos, que posteriormente producen quimiocinas que atraen neutrófilos a la vía aérea para eliminar al patógeno y, por tanto, localizar la infección, evitando su diseminación. Las células dendríticas presentes en el pulmón también reconocen a los alérgenos inhalados. Las células dendríticas tienen la capacidad de captar, procesar y presentar los antígenos en las moléculas MHC a los receptores de linfocitos T. Cuando existe un encuentro con un antígeno se produce la estimulación simultánea de los RPR presentes en la superficie celular o en los endosomas de las células dendríticas, lo que da lugar a un aumento de la expresión de receptores de quimiocinas como CCR7, que, al unirse a sus ligandos, dirigen el tráfico de células dendríticas hacia la zona de linfocitos T del ganglio linfático regional. En esta zona, las células dendríticas maduras presentan los péptidos antigénicos de los alérgenos inhalados a los linfocitos T CD4 vírgenes, e inducen la diferenciación a Th1 o Th2 (35).

La aplicación clínica de los agonistas de TLR como adyuvantes se viene realizando desde hace años. Descrito por Janeway como “el pequeño y sucio secreto de los inmunólogos”(38), porque se sabe que los adyuvantes, junto con el antígeno, son un componente crítico en la formulación de las vacunas para iniciar la respuesta inmune adaptativa (antígeno específica).

Los agonistas de TLRs, por su efecto inductor de la respuesta innata, pueden tener relevancia en el control de enfermedades alérgicas. El uso de agonistas de TLRs como adyuvantes de inmunoterapia se basa en que según el TLR que se potencie, diferentes vías de señalización son activadas. Compuestos que pueden controlar la sobreexpresión de citocinas Th2 o modificar el balance Th1/Th2 hacia Th1, pueden disminuir los síntomas de las enfermedades alérgicas. Se ha estudiado en ensayos clínicos el uso de 4 agonistas de TLR (TLR1, TLR4, TLR8 y TLR9) para tratamiento de enfermedades alérgicas. De estos, los ligandos de TLR4 y TLR9 son los más estudiados, ambos utilizados como adyuvantes de inmunoterapia: el monofosforil lípido A (MPL) se utiliza como adyuvante de inmunoterapia por su función agonista de TLR4, y las secuencias cortas de ADN con motivos CpG, agonistas de TLR9 (23).

La acción principal de los adyuvantes que modulan el modo de presentación del antígeno es dirigir a los alérgenos que llevan asociados hacia las APCs. Para conseguir este efecto, los alérgenos están sometidos a modificaciones físicas, químicas o combinadas. En las modificaciones físicas se combina el alérgeno con determinadas sustancias (hidróxido de aluminio, fosfato cálcico, tirosina, liposomas, etc.) con el objetivo de aumentar la eficacia y reducir los efectos adversos. Estas sustancias se unen al antígeno por adsorción, absorción y a veces por inclusión de los alérgenos dentro de las sustancias a las que se asocian. Con las modificaciones físicas se persigue mejorar las propiedades inmunológicas y un obtener un efecto depot, que permite una liberación lenta en el lugar de la inyección, lo cual disminuye el número de dosis necesarias y el número de reacciones adversas. En las modificaciones químicas se introduce un proceso que modifica la estructura química del alérgeno, con el fin de

aumentar de forma significativa la seguridad de la vacuna. Las técnicas empleadas con más frecuencia son la polimerización y la despigmentación.

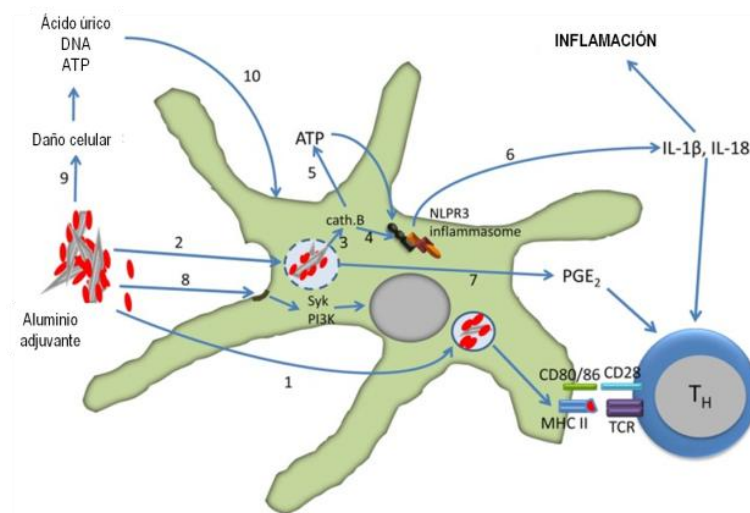
#### 4.2 HIDROXIDO DE ALUMINIO

Las sales de aluminio se utilizan de forma tradicional como adyuvante de vacunas, estando en la actualidad presente en vacunas contra enfermedades infecciosas, como difteria, tétanos, tosferina, hepatitis B, y enfermedades causadas por *Haemophilus influenzae* y el virus del papiloma humano. En 1926, Glenny describió por primera vez el efecto inmunoestimulador del aluminio en un modelo animal, demostrando que el toxoide de difteria precipitado con aluminio daba lugar a una respuesta de anticuerpos más potente que el toxoide sólo (39). Este trabajo fue la base para que el hidróxido de aluminio comenzara a ser utilizado en vacunas de tétanos, difteria, tosferina y tifus. El uso del aluminio en la formulación de las vacunas aumenta la concentración y avidéz de los anticuerpos específicos frente al antígeno, aumentado la proporción de población vacunada que desarrolla una respuesta inmune protectora, y la duración de esta respuesta.

El hidróxido de aluminio comenzó a utilizarse como adyuvante en las vacunas de alergia en 1938, cuando Sledge utilizó el efecto depot del hidróxido de aluminio para obtener una liberación retardada de los alérgenos desde el lugar de administración (40).

Además del efecto depot, al aluminio se le atribuyen ciertas propiedades inmunológicas, entre las que destaca la relación con el sistema inmune innato: prolonga la interacción entre las APCs y el antígeno, potencia el reclutamiento y activación de las APCs debido a la inducción de inflamación, facilita la fagocitosis del antígeno por las APCs y modula la interacción de APCs con linfocitos T. Más recientemente se ha descrito que el aluminio podría ejercer su acción a través de señales de peligro que activarían el inflamósoma NLRP3. A pesar de esto, el mecanismo de acción del aluminio sobre el sistema inmunológico no es totalmente

conocido La retención de los antígenos proporciona tiempo para que las APCs y células inflamatorias puedan interaccionar con el alérgeno de la vacuna en el lugar de la inyección (41-42) (Fig. 6).



*Figura 6. Efecto adyuvante del aluminio sobre las células dendríticas. La naturaleza del aluminio facilita la fagocitosis y la presentación de antígeno [1], la captura del aluminio produce la desestabilización y ruptura del fagolisosoma [2], que da lugar a la activación de la catepsina B [3]. La catepsina B induce la unión del inflammasoma NLPR3, directamente [4] o vía extracelular, mediante la liberación de ATP a través de canales de panexinas y conexinas [5]. La caspasa-1 rompe la pro-IL-1 $\beta$ , e IL-18 en formas activas que son liberadas desde la célula [6]. La desestabilización del fagolisosoma también induce la secreción de PGE<sub>2</sub> [7], y PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , e IL-18 producen la diferenciación de linfocitos T CD4 en linfocitos Th2. Los adyuvantes de aluminio interaccionan directamente con los lípidos presentes en la membrana celular, que dan lugar a la activación de las vías de señalización Syk y PI3-quinasa [8]. La inyección de vacunas con adyuvantes de aluminio provocan daño celular y necrosis con liberación de ácido úrico, ATP y ADN [9]. Estas moléculas sucesivamente activan las células dendríticas [10]. Modificado de Hogenesch y cols (42).*

Un efecto no deseado del aluminio como adyuvante en ITE s.c. es la capacidad de inducir una respuesta Th2 cuando se administra por vía s.c. asociado a un antígeno. El aluminio se utiliza frecuentemente en los modelos murinos para la inducción de la inflamación alérgica. Los protocolos incluyen la sensibilización de ratones mediante la administración repetida de inyecciones s.c. de un antígeno adsorbido en aluminio, dando lugar a una respuesta Th2 (43-45).

En los humanos, el proceso habitual de sensibilización en las enfermedades alérgicas, es muy diferente al de los modelos animales. Cualquier propiedad inmunomoduladora del aluminio como adyuvante, se produce sobre una respuesta inmune establecida, y será diferente al uso de hidróxido de aluminio como promotor de una respuesta inmune primaria en ratones sanos (33). Los pacientes tratados con ITE reciben inyecciones subcutáneas repetidas del alérgeno adsorbido en hidróxido de aluminio en dosis crecientes, recibiendo en conjunto dosis muy altas de alérgeno.

Estudios en cultivos de PBMC de pacientes atópicos con alérgenos describen un aumento de la respuesta Th2. Al añadir a estos cultivos aluminio, disminuye la respuesta Th2, pero no se modifica la Th1. Esta disminución de la respuesta Th2 puede explicarse por la inducción, por parte del hidróxido de aluminio, de anticuerpos IgG bloqueantes de IgE y de células T reguladoras, y esto justifica el uso satisfactorio del aluminio como adyuvante de ITE para enfermedades alérgicas durante décadas (31, 46). Estudios más recientes con inmunoterapia s.c en humanos, en la que se ha optimizado la relación entre alérgeno e hidróxido de aluminio, describen resultados similares, con un aumento del factor bloqueante de IgE, de IgG4 y de IgE (41).

En la actualidad, el hidróxido de aluminio es adyuvante más ampliamente utilizado en la ITE con alérgenos. Aproximadamente el 75% de las formulaciones para inmunoterapia subcutánea incluyen aluminio, habiendo probado su eficacia y buen perfil de seguridad (42, 47). El aluminio se considera un adyuvante seguro. Se han administrado billones de dosis de vacunas que contienen aluminio, desde hace más de 70 años, presentado un historial de seguridad excelente (48).

Sin embargo, recientemente se han publicado varios trabajos acerca de los efectos adversos del uso de aluminio como adyuvante en ITE s.c. (49-50). Cada inyección de ITE contiene entre 0.1 y 1.25 mg de aluminio. Una pauta habitual de ITE s.c. incluye unas 15 inyecciones anuales, durante 3 a 5 años. Los adyuvantes de aluminio contribuyen directa y significativamente a la carga corporal de aluminio de un individuo. El aluminio es escasamente soluble, por lo que no se distribuye de forma uniforme en toda la masa corporal, sino formando depósitos focales, que se localizaran

en el lugar de la inyección, o pueden ser transportados a otras regiones, como ganglios linfáticos o cerebro, zonas en las que el aluminio puede producir efectos tóxicos. Así, están descritos efectos adversos en el lugar de la inyección, los más frecuentes son los granulomas moderado-severos (51), y otros, menos frecuentes, como sarcoidosis subcutánea (52), esclerosis circunscrita progresiva (53), nódulos subcutáneos (54) y pseudolinfoma subcutáneo (55) .

El aluminio en cantidades elevadas es un conocido tóxico sanguíneo, óseo y neurológico, pero además existen datos que apuntan a que una exposición prolongada, a niveles relativamente bajos de aluminio, podría ser también neurotóxico (56). La inflamación y los eventos oxidativos que provoca el aluminio se han relacionado con la neurodegeneración que se produce en la enfermedad de Alzheimer, encontrándose aluminio asociado a los ovillos neurofibrilares de la proteína neurotóxica tau (57). Además se ha relacionado el aumento de incidencia de autismo con el número de vacunas con aluminio recibidas en la primera infancia (58).

#### **4.3 FOSFATO CALCICO**

El uso del fosfato cálcico como adyuvante fue desarrollado en el Instituto Pasteur en 1969. Inicialmente, fue utilizado durante muchos años en las vacunas contra tétanos, difteria y tos ferina, demostrando ser seguro y eficaz. Por este motivo, el fosfato cálcico comenzó a ser utilizado para inducir modificaciones físicas en los alérgenos. Esta modificación consiste en la adsorción del alérgeno en fosfato cálcico, dando lugar a un efecto depot, que disminuye la incidencia de reacciones adversas, mientras que provee al extracto de suficiente inmunogenicidad para conseguir un efecto clínico significativo (59-60).

Existen varios estudios acerca de los efectos sobre la respuesta inmune de la ITE de alérgenos adsorbidos en fosfato cálcico. En cuanto a los cambios humorales, en pacientes alérgicos que recibieron ITE con fosfato cálcico, se ha descrito un aumento de los niveles de IgG4. Por el contrario, el fosfato cálcico no modifica los niveles de IgE,

a diferencia de lo que ocurre con la ITE que utiliza aluminio, que sí los aumenta (60). Otro grupo comparó la producción de IgG4 en pacientes que recibieron ITE con polen de gramíneas y utilizaron como adyuvante hidróxido de aluminio o fosfato cálcico. Ambos tratamientos consiguieron un aumento significativo de IgG4, pero este fue mayor en aquellos que recibieron ITE con hidróxido de aluminio (61).

Estudios *in vitro* comparan los efectos del fosfato cálcico y del hidróxido de aluminio sobre la inmunidad celular. En cultivos de PBMC de pacientes atópicos con alérgenos se describe un aumento de la relación IL-4/ INF- $\gamma$ . Al añadir hidróxido de aluminio esta relación no se modifica, pero sí aumenta ligeramente al añadir fosfato cálcico, lo que indicaría un aumento de respuesta Th2 (62).

El fosfato cálcico es un constituyente normal del cuerpo humano, por lo que es bien tolerado y fácilmente reabsorbido. Este adyuvante es habitualmente considerado muy seguro, y se utiliza, en ocasiones, como alternativa al aluminio, ya que no produce nódulos subcutáneos (60, 63). Por el contrario, otros autores describen reacciones inflamatorias locales. En cobayas, estudios histopatológicos demuestran la formación de reacciones inflamatorias ricas en neutrófilos, macrófagos y células gigantes multinucleadas. Estas reacciones granulomatosas son similares a las producidas por el aluminio, aunque menos persistentes en el tiempo (4 semanas las producidas por el fosfato cálcico frente a 8 semanas las ocasionadas por el aluminio) (64).

#### 4.4 MONOFOSFORIL LÍPIDO A

Los lipopolisacáridos (LPS) son un componente de la pared celular de bacterias Gram negativas con propiedades adyuvantes. Su uso está limitado por su elevada toxicidad, ya que la administración parenteral de pequeñas cantidades de LPS puede inducir un estado de shock e inflamación que simula a una sepsis por Gram negativos.

El monofosforil lípido A (MPL) es un LPS purificado extraído de la pared celular de bacterias Gram negativo, en este caso de la *Salmonella minnesota* R595 (fig. 7). Es una



molécula que mantiene las propiedades adyuvantes pero con mucha menor toxicidad, por lo que ha sido aprobado en los últimos años como adyuvante en vacunas (65).

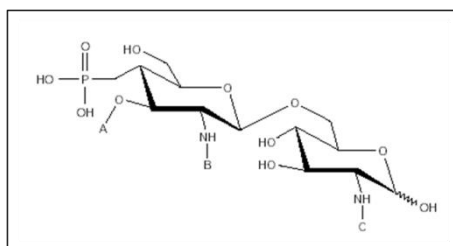


Figura 7. Estructura química del monofosforil lípido A. Tomado de Hopkins y cols. (66)

Los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos son el prototipo de ligandos de TLR4. En modelos murinos de inflamación pulmonar alérgica se han descrito efectos divergentes, supresores o potenciadores de la respuesta alérgica. La dosis de LPS representa un factor crítico en el efecto global sobre TLR4 en el curso de la respuesta alérgica. Así, dosis bajas de LPS promueven una respuesta Th2 al antígeno sensibilizante, y por tanto, inflamación eosinofílica; en cambio, dosis altas de LPS inducen una respuesta Th1 sin inflamación pulmonar eosinofílica. El efecto pro-alérgico de LPS a dosis bajas depende de la vía de señalización dependiente de MyD88 (67).

El mecanismo de acción de MPL como adyuvante radica en la función agonista parcial sobre los receptores TLR4, estimulando la inmunidad adaptativa en ausencia de inflamación significativa. MPL tiene la propiedad de saturar la vía dependiente de TRIF a través de la unión a TLR4, mucho más que la dependiente de MyD88. MPL induce, por tanto, niveles bajos de citocinas proinflamatorias como IL-6, mientras que al mismo tiempo potencia fuertemente la activación de linfocitos T y la secreción de citocinas dependientes de TRIF: RANTES, IP-10, mcp-1, además de IFN- $\beta$ , que dará lugar a un aumento de las MHC en las APCs, aumento de la expresión de CD80/86, CD40, y aumento de IL-12 e IL-18, lo que provoca un ambiente que conduce la respuesta inmune hacia la vía Th1 (fig. 8).

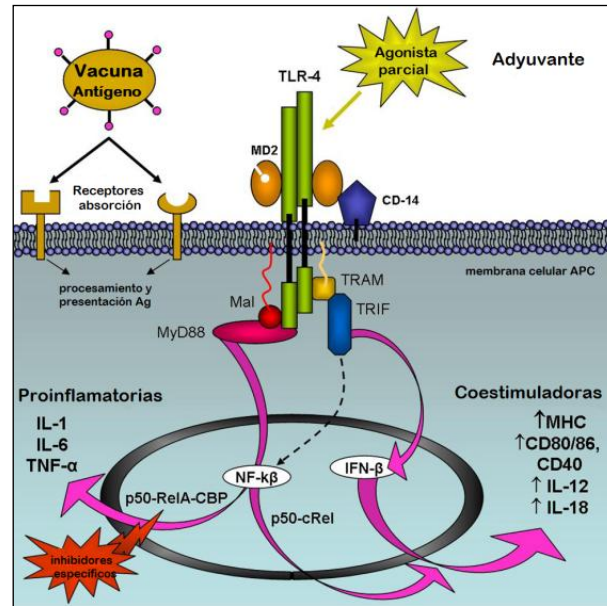


Figura 8. Vía de señalización de TLR4. MPL es un agonista parcial de TLR4, que potencia la vía de señalización dependiente de TRIF, mucho más que la dependiente de MyD88, conduciendo por tanto la respuesta inmune hacia la vía Th1. Figura modificada de Hauguel y cols. (68)

MPL está comercializado desde hace unos años, como adyuvante en vacunas contra enfermedades infecciosas, como hepatitis B, contra el cáncer, como Cervarix® contra el virus del papiloma humano, y en inmunoterapia específica para enfermedades alérgicas, bajo el nombre de Pollinex Quattro®. Esta última es de un alergoide (modificado con glutaraldehído) adsorbido en L-tirosina con MPL como adyuvante (69).

En cuanto a los cambios inmunológicos que produce esta vacuna, se ha analizado la respuesta humoral, encontrando una potente inducción de la respuesta de IgG1 e IgG4 específicas al alérgeno, y además no se detectó aumento de IgE específica durante el tratamiento ni durante la estación polínica (70-71).

Otro estudio en pacientes que recibieron Pollinex Quattro® frente a placebo, concluye que los pacientes que reciben la vacuna presentan un aumento en la producción de IFN-γ respecto al grupo placebo tras la reexposición al alérgeno. En cambio, las concentraciones de IL-4 e IL-5 aumentan en el grupo placebo, y no en el que recibe tratamiento con ITE (72).

Varios estudios avalan la eficacia clínica y seguridad de este producto, en pauta preestacional de 4 inyecciones (71, 73). En un estudio postmarketing de tres años con más de 3000 pacientes muestra una mejoría de síntomas en más del 90% de los pacientes (74). Además, estudios recientes concluyen que disminuye el grado de inflamación bronquial y consigue un beneficio clínico en pacientes asmáticos, manteniendo los síntomas controlados durante la estación polínica (75-76).

La tolerancia a Pollinex Quattro® ha sido comprobada en la práctica clínica, encontrando frecuencia de reacciones locales entre 2.2 y 8.1%. Se han reportado pocas reacciones adversas, la más frecuente rinitis leve. No se han reportado reacciones anafilácticas graves (77).

El tratamiento con inmunoterapia que utilice MPL como adyuvante consigue mejorar la inmunogenicidad específica e inespecífica, disminuyendo la alergenidad (78).

#### 4.5 SECUENCIAS INMUNOESTIMULADORAS (CpG-ODN)

En 1984 Tokunaga describió los efectos beneficiosos de fracciones de ADN del bacilo de Calmette-Guerín de *Mycobacterium bovis* para aplicaciones antitumorales, lo que tuvo un papel fundamental en el descubrimiento del ADN inmunoestimulador (79-80). Unos años más tarde, en 1995, Krieg confirmó que el ADN bacteriano tiene una capacidad inmunoestimuladora que no tiene el ADN de mamíferos, e identificó el patrón de secuencia de bases, o motivo, responsable de esta propiedad (81). Este patrón es un dinucleótido de citosina-guanina no metilado (CpG), que está presente con una frecuencia significativamente mayor en el ADN bacteriano que en el ADN de mamíferos (82).

Las secuencias CpG no metiladas actúan como ligandos de TLR9, estos ligandos incluyen ADN de virus (como herpes simplex o citomegalovirus murino), ADN bacteriano (como *Streptococcus pneumoniae*, *Propionibacterium acnés* y *Mycobacterium tuberculosis*), ADN de plásmidos o secuencias de

oligodesoxinucleótidos (ODN) cortas y sintéticas creadas por ingeniería, con motivos CpG. Estos ODN que contienen CpG se conocen como secuencias inmunoestimuladoras (ISS) y son la base para el desarrollo de vacunas por su amplia gama de aplicaciones y por sus formidables propiedades inmunoactivadoras (83). El ODN contiene motivos que forman dinucleótidos CpG rodeados de bases adicionales, con grupos tiofosforados que les confieren resistencia frente a endonucleasas.

TLR9 es un receptor intracelular que se encuentra en el retículo endoplásmico de células dendríticas plasmocitoides y linfocitos B inactivos. Cuando las células reconocen un PAMPs (CpG no metilado) se produce una rápida endocitosis del mismo, uniéndose posteriormente el motivo CpG a TLR9, para ser transferido al núcleo, donde comienzan los mecanismos de señalización y activación de la respuesta inmune (84-85) (figura 9).

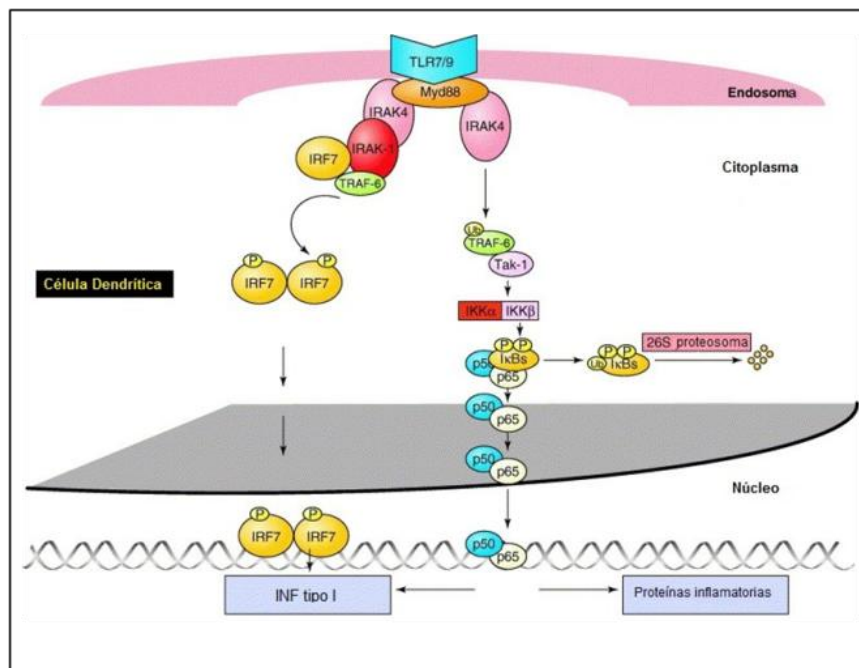


Figura 9. Vías de señalización de TLR7/9. Ambas vías son dependientes de MyD88, pero la activación de NF-κB es independiente de IRAK-1. (Figura modificada de Moynagh y cols. (86).

La mayoría de los efectos tempranos de la activación de TLR9 están relacionados con el sistema inmune innato: las células dendríticas plasmocitoides y los linfocitos B se

activan para liberar IL-10, IFN-1, IL-12, IP-10 y otras citocinas que actúan sobre varios tipos celulares, induciendo un entorno que regula la respuesta hacia Th1. Las células que responden a estas señales son los linfocitos NK, que secretan IFN- $\gamma$ , y los linfocitos T, que secretan IL-12 e IFN- $\gamma$ , además de otras células que amplifican y modulan la respuesta inmune. De forma más tardía, se produce la inducción de receptores coestimuladores, el cambio de isotipo de inmunoglobulina por los linfocitos B y activación de la cascada celular que promueve la respuesta inmune adaptativa (82, 87).

Múltiples estudios murinos demuestran que el tratamiento de enfermedades alérgicas con secuencias CpG reduce la secreción de citocinas Th2 mientras que induce la de citocinas Th1 (88-89). A pesar de esto, se ha demostrado también que la respuesta Th1 no es necesaria para que las secuencias CpG prevengan de una inflamación atópica (90). Este efecto de los ligandos de TLR9 se explica mediante la inducción de una respuesta de tipo regulador, en la que la IL-10 juega un papel fundamental, dando lugar a la activación directa de células dendríticas plasmocitoides, así como la generación indirecta de linfocitos Treg y linfocitos B (91).

En modelos animales, las secuencias CpG también han demostrado una disminución de la hiperreactividad bronquial y la inflamación de la vía aérea (45, 89), así como del remodelamiento de la misma (92-93). También se ha descrito en modelos animales que la enfermedad alérgica establecida (tanto nasal como bronquial) puede ser revertida con inmunoterapia que utiliza CpG como adyuvante (94-95). Consecuencia de estos estudios, existe un amplio consenso de que CpG ODN es uno de los agentes más potentes para inhibir o disminuir la respuesta Th2 que promueve la inflamación alérgica.

En cuanto a la experiencia en humanos, se han realizado estudios *ex vivo*, estimulando células mononucleares de sangre periférica de pacientes alérgicos, con ISS unido al antígeno mayor de la ambrosia (*Amb a1*), produciéndose un cambio en el perfil de citocinas que se esperaba que indujera la ambrosia: disminución de la producción de IL-5 y aumento de INF- $\gamma$  (96).

Dado los excelentes resultados obtenidos en modelos animales y estudios *ex vivo* en humanos, comenzaron a realizarse ensayos clínicos con ISS. Dos estudios fase II, en los que se administraron dosis crecientes de ISS junto con polen de Ambrosia, mostraron una disminución de citocinas Th2 y aumento de IFN- $\gamma$  en los paciente tratados con la vacuna respecto a los tratados con placebo. Se detectó mejoría de síntomas y disminución del uso de medicación (97-98). Otro ensayo fase II/III, multicéntrico, que incluía 700 pacientes, sólo detectó una débil mejoría de su parámetro principal (mejoría de síntomas nasales), estos resultados se atribuyeron a una posible inclusión errónea de pacientes o a una temporada con una débil polinización.

En los últimos años se está potenciando la investigación del uso de secuencias CpG como monoterapia en enfermedades alérgicas, es decir, utilizar secuencias CpG como tratamiento sin alérgeno asociado. Este tipo de tratamiento aportaría dos ventajas sobre la inmunoterapia convencional: sería más sencillo y barato disponer de una vacuna eficaz para cualquier paciente alérgico, y no desarrollar una vacuna separada para cada alérgeno, y además los pacientes polisensibilizados se beneficiarían especialmente, ya que la ITE en ellos es mucho menos eficaz (99).

Las secuencias CpG también están siendo estudiadas en el campo de la oncología por su efecto antitumoral, mostrando resultados prometedores en melanomas y otros tipos de cáncer de piel, y en glioblastomas. También se desarrollan estudios para utilizarlo como adyuvante de vacunas para el cáncer (melanoma y cáncer de pulmón de células grandes) (100).

En resumen, las sales de aluminio se vienen utilizando tradicionalmente, como adyuvante, formando parte de la composición de las vacunas antiinfecciosas, así como en los extractos administrados para inmunoterapia subcutánea convencional en los pacientes alérgicos. En modelos de experimentación animal, las sales de aluminio, paradójicamente, se utilizan como un inductor de respuesta Th2. La identificación de

adyuvantes alternativos que indujeran una respuesta Th1 y T reguladora, mejoraría la eficacia de la inmunoterapia como tratamiento para el asma y otras enfermedades alérgicas. No existen en la literatura científica suficientes estudios que comparen la eficacia ni el mecanismo de acción de estos adyuvantes entre sí. Sobre esta base, se propone realizar un estudio que compare la eficacia de cada uno de los adyuvantes, desde un punto de vista inmunológico, de función respiratoria e histología pulmonar.

## **5. MODELOS MURINOS DE INFLAMACION PULMONAR ALÉRGICA**

Los modelos animales para el estudio del asma se utilizan desde hace aproximadamente 100 años. Las especies más empleadas para experimentación no desarrollan espontáneamente una condición que pueda definirse como asma. Por ello, para el estudio del asma en modelos animales, es necesario inducir una inflamación pulmonar artificial similar a la inflamación presente en el asma bronquial (101). En cualquier modelo animal la relación entre el proceso observado en el animal y en el humano necesita ser considerada con cuidado. A pesar de que ningún modelo animal reproduce por completo las características del asma humano, cada hallazgo debe ser valorado por sus méritos relativos y su relevancia biológica. La principal ventaja de utilizar modelos animales de inflamación pulmonar alérgica es la posibilidad de manipular el proceso de sensibilización, permitiendo una gran estandarización, y la posibilidad de investigar los mecanismos patogénicos asociados al desarrollo del fenotipo asmático (102). Un ejemplo clásico de identificación de mecanismos fisiopatológicos a través de modelos animales, es la descripción de las vías Th1 y Th2 en modelos murinos de inflamación alérgica, y la importancia del fenotipo Th2 en la progresión de la enfermedad alérgica (101). Los modelos animales poseen también un papel fundamental en el desarrollo de nuevos tratamientos, siendo el punto de partida para posteriores ensayos clínicos de seguridad y eficacia clínica en humanos.

Los animales más utilizados para el estudio de la respuesta alérgica en la vía aérea son los ratones, especie ideal dado el amplio conocimiento que se tiene de su genética, y

su fácil manipulación con tecnología transgénica. Los modelos murinos son capaces de reproducir muchas de las características principales del asma alérgico, entre ellas la inflamación de características Th2 y la respuesta de la vía aérea a agentes broncoconstrictores. Estas características varían considerablemente entre las distintas cepas. La variabilidad entre cepas permite la identificación de mecanismos celulares y genéticos implicados en el asma, ya que es posible potenciar o inhibir una determinada vía molecular para así estudiar su importancia en el desarrollo del fenotipo alérgico (101). Los ratones de la cepa BALB/c son uno de los que mejor producen la respuesta Th2 (103).

Los protocolos clásicos para el desarrollo de la inflamación pulmonar alérgica, comienzan con la administración sistémica (vía subcutánea o intraperitoneal) de un alérgeno adsorbido en un adyuvante. Según el tiempo de exposición al alérgeno, se pueden obtener modelos de inflamación pulmonar aguda o crónica, así inyectándose entre una y tres dosis, administradas semanalmente, se provoca una inflamación aguda de la vía aérea de los ratones; en cambio, realizando una exposición a dosis repetidas de alérgeno durante al menos doce semanas, se obtiene un modelo de inflamación pulmonar crónica (104). Existen también modelos en los que la sensibilización se realiza a través de la exposición crónica por vía respiratoria, que han mostrado la posibilidad de acercarse a una patología con mayor similitud con el asma bronquial humano, con eosinofilia en la vía aérea y una HRB persistente en el tiempo (105).

El alérgeno clásicamente utilizado para los modelos de inflamación pulmonar es la ovoalbúmina (OVA), un antígeno presente en el huevo, de fácil accesibilidad y gran poder antigénico, y, como adyuvante, el hidróxido de aluminio, por su capacidad de dirigir la respuesta inmune hacia la vía Th2 en ratones (106).

En los últimos años se han desarrollado modelos animales que utilizan aeroalérgenos, ya que son los causantes naturales del asma en humanos. Hay modelos descritos con ácaros del polvo, hongos y también pólenes. En nuestro estudio utilizaremos el polen de olivo (según el modelo desarrollado en el 2007 por Conejero y cols (43)), ya que



además de ser un aeroalérgeno relevante para la patología humana, es uno de los pólenes más prevalentes en el área mediterránea.

La histología de la vía aérea de animales pequeños puede ser examinada mediante una gran variedad de métodos. En ratones sensibilizados, la respuesta inflamatoria a la provocación con el alérgeno, habitualmente provoca una inflamación en la vía aérea diferente a la humana. Se produce gran acúmulo de células inflamatorias, con marcado edema en región perivascular. La inflamación peribronquial es variable, tanto en cantidad como en extensión (107).

La función pulmonar en modelos murinos puede medirse mediante diferentes métodos, que incluyen técnicas *in vivo* no invasivas, *in vivo* invasivas e *in vitro*. Las medidas más precisas requieren las técnicas más invasivas, como la técnica de oscilación forzada o el sistema de maniobras forzadas. Por otro lado, estas técnicas invasivas, se alejan mucho de las condiciones naturales de respiración, ya que es preciso que el animal esté anestesiado, paralizado y traqueostomizado (108). La técnica más utilizada en los últimos años, y la utilizada en este estudio, es la pletismografía barométrica no invasiva. Esta técnica se realiza con el animal consciente y mide un parámetro conocido como Penh, que puede ser considerado como un parámetro de resistencia de la vía aérea, por su correlación con los cambios en los patrones respiratorios provocados por la broncoconstricción. Aun así, esta técnica tiene una serie de limitaciones, entre las que se incluyen: (1) es altamente dependiente de la frecuencia respiratoria, (2) los ratones sólo pueden respirar por la nariz, por lo que Penh estará influenciado por la inflamación de la vía aérea superior, (3) cambios en las características del aire de la cámara, como cambios de humedad, pueden alterar la presión dentro de la misma (101).

En resumen, cada modelo tiene sus ventajas y desventajas que deben ser reconocidas a la hora de interpretar los resultados de los estudios. A pesar de que los modelos animales de asma han mejorado enormemente los conocimientos acerca de la fisiopatología de la enfermedad, no están exentos de limitaciones. Esto se demuestra

por el fallo de algunas estrategias terapéuticas en ensayos clínicos, cuando previamente habían demostrado su eficacia en modelos animales (109).

Dada la elevada prevalencia mundial de asma y alergia, es necesario mejorar los tratamientos etiológicos. Por este motivo se deben encontrar adyuvantes para la inmunoterapia específica que mejoren la actividad inmunológica de las vacunas. Un modelo animal es una buena herramienta para poder comparar la eficacia y los efectos adversos de cada uno de los adyuvantes utilizados en los tratamientos de ITE en el hombre.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

**Hipótesis** de trabajo: Los adyuvantes que aumentan la respuesta inmune mejoran la eficacia clínica de la inmunoterapia específica, sin embargo, los efectos de los diferentes adyuvantes son distintos, tanto clínica como inmunológicamente.

El **objetivo general** de este proyecto es la comparación de la eficacia, clínica e inmunológica, de diferentes adyuvantes para inmunoterapia específica de las enfermedades alérgicas en un modelo experimental murino.

Los **objetivos concretos** que nos proponemos son:

**1.** Comparar el efecto inmunológico “*in vitro*” de diferentes adyuvantes utilizados en inmunoterapia para las enfermedades alérgicas, mediante la determinación de inmunoglobulinas específicas y su repercusión sobre el perfil de citocinas:

**1.1** Estudio comparativo de la respuesta inmune primaria de los adyuvantes en ratones sanos

**1.2.** Estudio comparativo de la respuesta inmune secundaria de los adyuvantes en el modelo de inflamación bronquial alérgica por sensibilización a polen de *O. europaea*.

**2.** Comparar el efecto de los adyuvantes sobre el órgano diana, el pulmón, mediante el estudio “*in vivo*” de la función respiratoria y de la histología pulmonar en los diferentes grupos de ratones.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1. MATERIALES

### 1.1 ANIMALES

Se utilizaron ratones hembras BALB/c (IFFA CREDO, S.A., España) de 4-6 semanas de edad, distribuidos de forma homogénea ( $n= 6-8$ ), en los diferentes grupos experimentales. Los ratones se estabularon en el animalario del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Se mantuvieron bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con acceso libre a comida y agua (figura 10).



*Figura 10. Ratones de la cepa BALB/c de 4-6 semanas de edad utilizados para los experimentos.*

Los animales fueron tratados siguiendo siempre las Normas Éticas en Investigación con Animales (Real Decreto 1201/2005, B.O.E. 10 de Octubre del 2005, sobre protección de animales utilizados para fines de experimentación y otros fines científicos).

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Centro autorizado

como Establecimiento Usuario con el número EX-017-U, Dirección General de Agricultura y Alimentación, Consejería de Economía y Empleo, Comunidad de Madrid).

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético para uso de animales de experimentación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

## 1.2 ALÉRGENOS

Se empleó un extracto proteico liofilizado crudo de polen de *Olea europaea* proveniente siempre del mismo lote (Laboratorios Inmunal, España)

## 1.3 ADYUVANTES

Se prepararon los extractos de olea junto con los siguientes adyuvantes:

- Hidróxido de aluminio (laboratorio Sigma-Aldrich)
- Fosfato cálcico (cedido por laboratorio Stallergenes)
- MPL (cedido por laboratorio Allergy Therapeutics)
- ISS-ODN: oligonucleótidos tiofosforados sintéticos de secuencias inmunoestimuladoras de ADN, con la secuencia:

5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3

(Laboratorio Trilink Biotechnologies, San Diego, EE UU).

Como control se utilizó suero salino fisiológico al 0.9%.

## 1.4 ELISA: ANTICUERPOS, REACTIVOS Y MATERIAL PLÁSTICO

Para la cuantificación de inmunoglobulinas y citocinas se empleó la técnica ELISA. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- Ac de detección anti-IgG1 AP: IgG de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con fosfatasa alcalina, (Cat. 1070-04, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, EE UU).
- AC de detección anti-IgG2a AP: IgG de cabra anti-IgG2a de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (Cat. 1080-04, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, EE UU).
- Ac de detección anti-IgE purificado: IgG1 de rata anti-IgE de ratón (Clon R35-92, BD Pharmingen<sup>TM</sup>, San Diego, EEUU)
- Set de Ac de captura y detección anti- IL4 de ratón, conjugados con estreptavidina-HRP (BD555232, BD OptEIA<sup>TM</sup>)
- Set de Ac de captura y detección anti IFN- $\gamma$  de ratón, conjugados con estreptavidina-HRP (BD555138, BD OptEIA<sup>TM</sup>)
- Ac de captura anti-IL5: IgG1 de rata purificado anti-IL5 de ratón (BD554393, BD Pharmingen<sup>TM</sup>, San Diego, EEUU)
- Ac de detección anti-IL5: IgG1 de rata purificado anti-IL5 de ratón (BD554397, BD Pharmingen<sup>TM</sup>, San Diego, EEUU)
- Ac de captura antiIL-10: IgG1 de rata biotilnado anti-IL10 de ratón (BD551215, BD Pharmingen<sup>TM</sup>, San Diego, EEUU)
- Ac de detección anti-IL10: IgG2b de rata biotilnado anti-IL10 de ratón (BD554465, BD Pharmingen<sup>TM</sup>, San Diego, EEUU)

Todos los anticuerpos empleados fueron monoclonales excepto los que se emplearon para detectar IgG1 e IgG2a que fueron policlonales.

Para diseñar la curva estándar se emplearon péptidos recombinantes para la medición de las citocinas, y un pool de sueros de ratones inmunizados para tal fin, para las inmunoglobulinas.



Los reactivos utilizados fueron:

- Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, NO, EEUU).
- 4- nitrofenil-fosfato (4-NPP) (Roche, Mannheim, Alemania).
- Sepharosa-Proteína G (Pharmacia, Uppsala, Suecia).
- Estreptavidina-Horseradish Peroxidase Conjugate (Laboratorio Sigma, St. Louis, MO, EEUU).
- Sustrato tetrametilbencidina (TMB), BD555214, (Laboratorios Kirkegaard & Perry, MD, EEUU)

Para la realización de la técnica Elisa utilizamos placas de poliestireno de fondo plano y alta absorción de 96 pocillos (3690, Costar®, Nueva York, EEUU)

### **1.5 CULTIVOS CELULARES**

Tras sacrificar a los ratones, se realizaron los experimentos in vitro con esplenocitos de los mismos. El material empleado para los cultivos celulares fue:

Medios y reactivos:

- Medio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU).
- Medio DMEM (Gibco BRL, Paisley, Gran Bretaña).
- Glutamina (Gibco BRL, Paisley, Gran Bretaña).
- Tripsina-EDTA (Gibco BRL, Paisley, Gran Bretaña).
- Suero bovino fetal (FBS) de Gibco BRL (Gibco BRL, Paisley, Gran Bretaña).
- $\beta$ -mercaptoetanol (Life Technologies, California, EE UU).

Antibióticos:

- Estreptomicina (Cepa, Madrid, España).
- Penicilina (Ern, Barcelona, España).

Material plástico:

- Tubos de 15 y 50 ml (Falcón, Becton Dickinson, NJ, EEUU)
- Placas de 12 y 96 pocillos (Costar®, Nueva York, EEUU)
- Pipetas de 1, 5, 10 y 25 ml (Sarstedt, Ingle Farm, Australia)

#### **1.6 OTROS REACTIVOS**

- Metacolina (Sigma, St. Louis, EE UU).
- Parafina Paraplast Embedding Media (Sigma, St. Louis, MO, EEUU).
- Hematoxilina (Sigma, St. Louis, MO, EEUU).
- Eosina (Sigma, St. Louis, MO, EEUU).
- Ácido periódico y reactivo de Schiff (PAS) (Sigma, St. Louis, MO, EEUU)

Todos los reactivos generales fueron de grado analítico y se obtuvieron de las siguientes casas comerciales Merck, Sigma, Roche y Carlo Erba.

#### **1.7 APARATOS EMPLEADOS**

- Pletismógrafo corporal total Buxco, Troy, Nueva York, EEUU)
- Espectrofotómetro (Bio Rad, Modelo 3550, Richmond, California)

## 2. MÉTODOS

### 2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE PRIMARIA A LA CO-ADMINISTRACIÓN DE *OLEA EUROPAEA* Y ADYUVANTES

Para comparar el efecto de los diferentes adyuvantes en la respuesta inmune primaria, se utilizaron ratones Balb/c no sensibilizados, a los que se les administraron tres dosis de extracto de *O. europaea* con diferentes adyuvantes. Para ello se dividió a los ratones en 6 grupos homogéneos (de 6 individuos cada uno) y a cada uno de estos grupos se le administró un tratamiento diferente:

- Grupo 1: Olea + Hidróxido de aluminio (Olea 10 µg + Aluminio 219 µg en 200 µl de suero salino 0.9% /dosis)
- Grupo 2: Olea + Fosfato cálcico (Olea 10 µg + 280 µg fosfato cálcico en 200 µl de suero salino 0.9% /dosis)
- Grupo 3: Olea + MPL (Olea 10 µg + MPL 110 µg en 200 µl de suero salino 0.9% /dosis )
- Grupo 4: Olea + ISS (Olea 10 µg + ISS 51.6 µg en 50 µl de suero salino 0.9% /dosis )
- Grupo 5: Olea + Suero salino (Olea 10 µg en 200 µl de suero salino 0.9% /dosis)
- Grupo 6: Suero salino + Suero salino (200 µl de suero salino 0.9% /dosis)

Todos los grupos recibieron el tratamiento por vía s.c. en inyecciones de 200 µl de volumen, excepto los ratones del grupo olea-ISS, que recibieron 50 µl intradérmico, en la base de la cola.

Se establecieron 4 grupos de inmunización activa: olea-aluminio, olea-fosfato cálcico, olea-MPL y olea-ISS. El grupo olea-salino, fueron ratones que recibieron extracto de

polen de olivo sin adyuvante y se utilizaron como control para valorar el efecto de los adyuvantes y el grupo salino-salino fue el grupo basal.

Se administraron tres dosis de cada uno de estos tratamientos, con un intervalo de tiempo entre cada dosis de una semana (semana 1, 2 y 3 del experimento).

Una vez inmunizados los ratones, en la semana 5 se provocó una respuesta inflamatoria en las vías respiratorias, mediante la exposición vía intranasal al alérgeno. Esto se realizó mediante anestesia general y realizando una instilación intranasal, dos días consecutivos, con 15  $\mu\text{g}$  de olea en 30  $\mu\text{l}$  de suero salino a cada ratón. Al grupo de ratones salino-salino (grupo basal) se le administró 30  $\mu\text{l}$  de suero salino estéril intranasal. Al día siguiente de la última instilación con polen de *O. europaea*, se realizó una prueba de hiperreactividad bronquial inespecífica a cada uno de los ratones.

Un día después se procedió al sacrificio de los ratones para extracción del bazo y del lóbulo pulmonar inferior derecho. Del primero se realizó cultivo de esplenocitos para cuantificación de citocinas y del segundo se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina y PAS para estudio anatomopatológico pulmonar. El esquema de intervención de muestra en la figura 11.

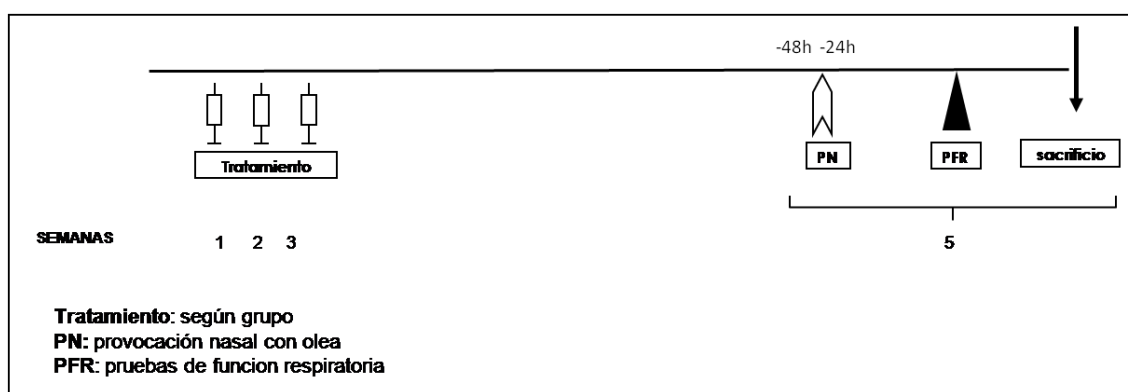


Figura 11: Esquema de intervención para el estudio de la respuesta inmune primaria a la administración de olea con adyuvantes

Las muestras sanguíneas para determinación de inmunoglobulinas séricas se obtuvieron mediante punción en el plexo retro-orbitario con capilares sin heparinizar (Blaubrand®, intraMARK, Ginebra, Suiza). Los animales fueron previamente anestesiados por vía inhalatoria con isoflurano, (Forane®, Abbot, Queenborough, Kent, Gran Bretaña). Las extracciones se realizaron tres tiempos diferentes: basal en la semana 0, después de la inmunización en la semana 4 y después de la provocación intranasal en la semana 5.

Se recogieron aproximadamente 100 µl de sangre por ratón y extracción. Para obtener el suero se centrifugaron las muestras 10 minutos a 14.000 g a 4°C. Los sueros se almacenaron a -20° C hasta su posterior utilización.

## **2.2 MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMACION BRONQUIAL ALÉRGICA POR SENSIBILIZACION A POLEN DE *O. EUROPAEA***

Para lograr el modelo experimental murino de inflamación pulmonar por sensibilización a polen de *O. europaea*, se reprodujo el protocolo diseñado por Conejero y cols (43) (fig. 12). Primero se dividió a los ratones en dos grupos:

- Grupo olea + hidróxido de aluminio: 40 ratones fueron sensibilizados a polen de *O. europaea* mediante la administración de tres dosis subcutáneas (s.c.) de olea adsorbida en hidróxido de aluminio. Cada uno de los ratones recibió olea en hidróxido de aluminio en una proporción de 25 µg/500 µg, en 200 µl de suero salino estéril, con un intervalo de 7 días entre cada una de las dosis, lo que correspondió a las semanas 1, 2 y 3 del experimento.
- Grupo de ratones sanos (grupo control): 8 ratones recibieron 200 µl de suero salino estéril vía s.c., esta administración se hizo los mismos días que se sensibilizó al grupo de ratones alérgicos.

En la semana 5 se realizó una prueba de función pulmonar, para comprobar la hiperreactividad bronquial del grupo de ratones que había sido sensibilizado a polen de olivo. Los ratones sensibilizados fueron expuestos al alérgeno mediante la instilación intranasal de polen de *O. europaea* (15 µg de olea en 30 µl de suero salino a cada ratón). Al grupo de ratones sanos se le administró 30 µl de suero salino estéril intranasal. Estas instilaciones se realizaron en dos días consecutivos, 48 y 24 horas antes del estudio de función pulmonar.

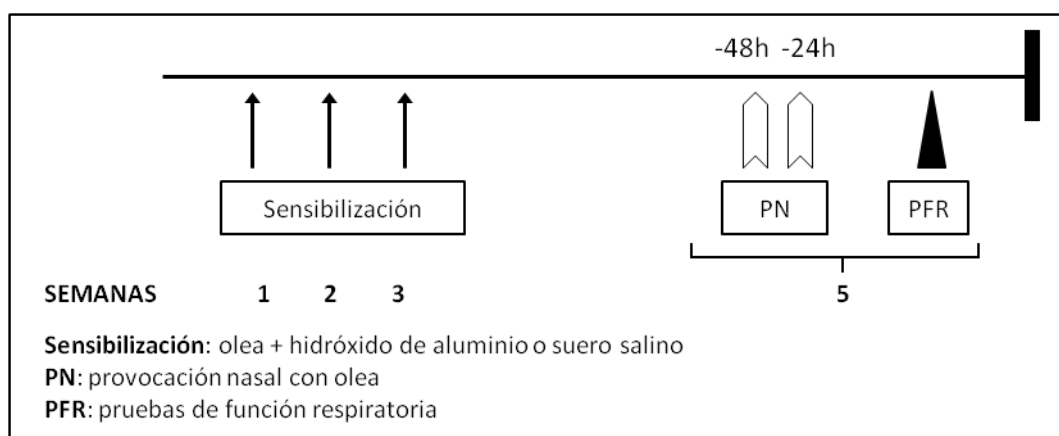


Figura 12: Esquema de intervención para el desarrollo del modelo experimental murino de inflamación pulmonar alérgica

Se realizaron dos extracciones sanguíneas, una basal, en la semana 0, y otra en la semana 4, tras la sensibilización.

### 2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE SECUNDARIA A LA CO-ADMINISTRACIÓN DE OLEA CON ADYUVANTES EN RATONES SENSIBILIZADOS A POLEN DE *O. EUROPAEA*

Para el estudio de la respuesta inmune secundaria, los ratones fueron inicialmente sensibilizados a polen de *O. europaea*, mediante la administración de inyecciones (200 µl, vía s.c.) de olea e hidróxido de aluminio (25 µg/500 µg) durante tres semanas

consecutivas, excepto el grupo control que recibió inyecciones de 200 µl de suero salino. El grupo de ratones sensibilizados a polen de olivo posteriormente se dividió en 5 grupos homogéneos de 6 a 8 individuos cada uno, y a cada grupo se le asignó un tratamiento.

En las semanas 5, 6 y 7 se procedió a la intervención terapéutica con las distintas modalidades de inmunoterapia:

- Grupo 1: Olea + Hidróxido de aluminio (Olea 10 µg + Aluminio 219 µg en 200 µl de suero salino 0.9% /dosis)
- Grupo 2: Olea + Fosfato cálcico (Olea 10 µg + 280 µg fosfato cálcico en 200 µl de suero salino 0.9% /dosis)
- Grupo 3: Olea + MPL (Olea 10 µg + MPL 110 µg en 200 µl de suero salino 0.9% /dosis )
- Grupo 4: Olea + ISS (Olea 10 µg + ISS 51.6 µg en 50 µl de suero salino 0.9% /dosis )
- Grupo 5: Olea + Suero salino (Olea 10 µg en 200 µl de suero salino 0.9% /dosis)
- Grupo 6: Suero salino + Suero salino (200 µl de suero salino 0.9% /dosis)

Se utilizaron de 6 a 8 ratones por condición. La administración de los distintos tratamientos se realizó por vía s.c., excepto olea/ISS que se administró intradérmica (i.d.) en la base de la cola.

La semana 9, los ratones fueron expuestos en dos días consecutivos al alérgeno por vía intranasal, con el fin de desarrollar una respuesta inflamatoria a nivel de las vías respiratorias. Cada uno de los ratones, bajo anestesia general, recibió 15µg de olea en 30µl de suero salino. Al grupo de ratones no sensibilizados fue provocado con 30µl de

solución salina estéril. Un día después de la última instilación intranasal con el alérgeno se realizó el estudio de hiperreactividad bronquial inespecífica.

Al día siguiente se realizó el sacrificio de los ratones para extracción del bazo y obtención de esplenocitos, así como del lóbulo pulmonar inferior derecho para estudio histopatológico del tejido pulmonar.

El esquema de intervención se representa en la figura 13:

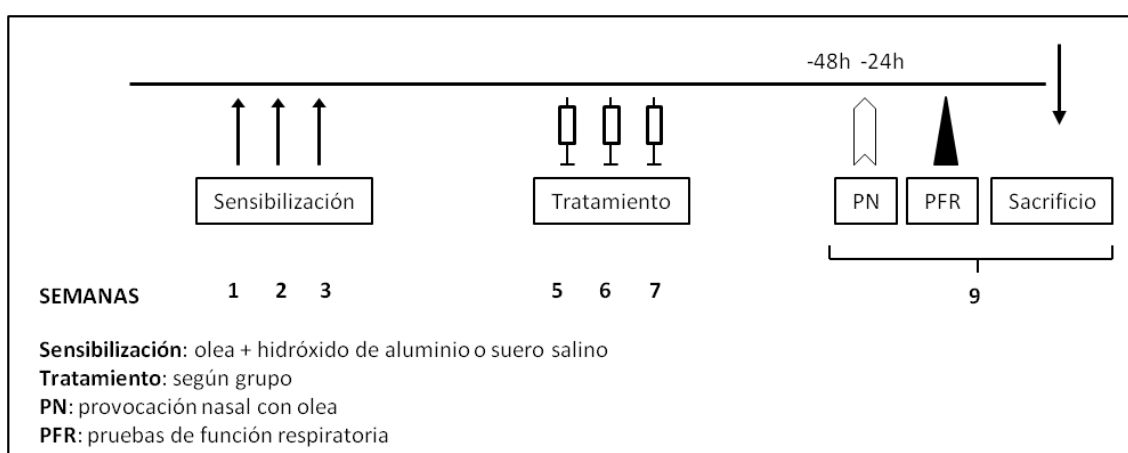


Figura 13: Esquema de intervención para el estudio de la respuesta inmune secundaria al tratamiento con olea y adyuvantes en ratones sensibilizados a polen de olivo.

Las extracciones sanguíneas se realizaron mediante punción en el plexo retro-orbitario, con los animales previamente anestesiados. Las extracciones se realizaron en diferentes momentos de los experimentos: basal, después de la sensibilización y después del tratamiento (semanas 0, 4 y 8 del experimento).

## 2.4 ANÁLISIS DE LA INMUNIDAD HUMORAL

Los niveles de Inmunoglobulinas se cuantificaron mediante ensayos de ELISA. Se siguió el protocolo descrito por Raz y colaboradores (110) en 1996 con algunas modificaciones.



#### 2.4.1 IgG1 e IgG2a:

Se fijaron 0.25 µg de olea en tampón borato sódico (BBS) a pH 8, a una concentración de 5 µg/ml, en cada pocillo de la placa de microtitulación. Las placas se incubaron durante 18 horas a 4°C. A continuación se realizaron cinco lavados con 0.05% de Tween 20 en BBS y se procedió al bloqueo con 1% de BSA en PBS durante 2 horas a 37°C. Tras la realización de lavados, se dispusieron 4 diluciones seriadas de las muestras séricas (1/100, 1/300, 1/900, 1/2700) en 1% de BSA en PBS, y las placas se incubaron con 50µl de cada dilución en cada pocillo, durante 18 horas a 4°C. Al día siguiente se eliminó el suero de las placas y se realizaron 5 lavados de las placas con 0.05% de Tween 20 en BBS. Posteriormente se añadieron los anticuerpos anti-IgG1 ó anti-IgG2a conjugados con fosfatasa alcalina (0.5 µg/ml), en tampón de bloqueo durante 2 horas. Pasado este tiempo, se lavaron las placas (5 lavados con 0.005% Tween 20 en BBS), y se añadió el sustrato, 4-nitro-fenil-fosfato (4-NPP) en dietanolamina al 10%. La reacción colorimétrica se leyó en el espectrofotómetro (Bio Rad, Modelo 3550, Richmond, CA, EEUU), a una absorbancia de 405 nm, a los 60 minutos después de haber añadido el sustrato. Los resultados fueron procesados con el programa DeltaSoft PC (BioMetallic Inc, Princeton, NJ, EEUU).

Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias por ml (UA/ml) respecto a la curva estándar obtenida por un pool de sueros de ratones hiper-inmunizados con extracto de olea europea. Para las curva de IgG1, se sensibilizaron los ratones mediante inyecciones vía s.c. de olea en hidróxido de aluminio (25 µg/500 µg), durante 5 semanas consecutivas. En el caso de IgG2a, los animales también fueron inmunizados durante 5 semanas consecutivas, pero en este caso, con ISS y olea (25 µg/10 µg), vía i.d.

#### 2.4.2 IgE:

Previo a la realización de este método, se procedió a la eliminación de IgG del suero. Esto se realizó mediante la incubación de las muestras de suero con Sepharosa Proteína G en BBS durante toda la noche, a una temperatura de 4°C, en agitación, de manera que la IgG quedó unida de forma covalente a la Sepharosa proteína G, y los sueros libres de IgG y diluidos 1:10.

Una vez separada la IgG, se comenzó el ELISA para determinar la IgE. Las placas de microtitulación de 96 pocillos se incubaron con 5 µg/ml de olea en tampón carbonato (pH 9'6) durante 18 horas, a 4°C. A continuación se lavaron con 0.05% de Tween 20 en BBS y se bloquearon con 1% de BSA en PBS durante 2 horas a 37°C. Las placas se lavaron y se incubaron a 4°C durante la noche con 4 diluciones seriadas (1/10, 1/20, 1/40 y 1/80) de las muestras de suero en BSA al 1% en PBS. Al día siguiente las placas se lavaron con 0.05% de Tween 20 en BBS y fueron incubadas con el anticuerpo anti-IgE (6 µg/ml), en tampón de bloqueo (BSA al 1% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lavaron de nuevo las placas con 0.05% de Tween 20 en BBS y, finalmente, se incubaron con estreptavidina-peroxidasa (0'625 µg/ml) en tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, y tras lavar las placas, se añadió el sustrato TMB. La reacción se detuvo con ácido fosfórico 1M. La absorbancia se leyó en el espectrofotómetro a 450 nm empleando el filtro de 650 nm como referencia. Los resultados fueron procesados con el programa DeltaSoft PC.

Las curvas patrón se realizaron con el suero de un grupo de ratones que habían sido previamente inmunizados para tal fin. Se sensibilizó a los ratones mediante inyecciones vía s.c. de olea en hidróxido de aluminio (25 µg/500 µg), durante 5 semanas consecutivas. Los resultados se han expresado como unidades arbitrarias por mililitro (UA/ml).

## 2.5 ANALISIS DE LA INMUNIDAD CELULAR

### 2.5.1 CULTIVO DE ESPLENOCITOS

Los bazo de los ratones se obtuvieron de forma aséptica, inmediatamente después del sacrificio, mediante incisión abdominal lateral izquierda. Se disgregaron las células del bazo, y fueron resuspendidas en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (FBS), 2 mM L-glutamina, 0'05 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y antibióticos (estreptomicina 120  $\mu$ g/ml y penicilina 120 unidades/ml). Se sembraron  $5 \times 10^5$  células por pocillo ( $2'5 \times 10^6$  células/ml) en placas de 96 pocillos (Costar, Nueva York, EE UU). Los cultivos se realizaron por triplicado, con o sin estímulo alérgico (olea, 50  $\mu$ g/ml). Las células se incubaron durante 3 días a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> y se recogieron los sobrenadantes a las 72 horas. Los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos se guardaron a -20°C, y, posteriormente, se utilizaron para la detección, mediante ELISA, de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$ .

### 2.5.2 DETERMINACIÓN DE CITOCINAS EN SOBRENADANTE DE CULTIVO DE ESPLENOCITOS

Las determinaciones de citocinas se realizaron mediante método ELISA de los sobrenadantes obtenidos del cultivo de de esplenocitos.

#### 2.5.2.1 IL-4 e INF- $\gamma$

Se incubaron los anticuerpo de captura de IL-4 (1:250) o INF- $\gamma$  (1:250) en tampón carbonato (pH 9.6) durante 18 horas a 4°C. Se realizaron lavados con 0.05% de Tween 20 en BBS, y se bloqueó la placa con 1% BSA en PBS durante dos horas a 37°C. Posteriormente se añadió el sobrenadante de cultivo de esplenocitos, así como cantidades conocidas de las citocinas para la curva patrón (diluciones seriadas 1:2 a partir de IL-4 500 pg/ml y de IFN- $\gamma$  4000 pg/ml), y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Tras realizar lavados con 0.05% de Tween 20 en BBS, se añadieron los anticuerpos de detección de IL-4 o IFN- $\gamma$  en 1% BSA en PBS

(1:500) y, finalmente, se añadió estreptavidina-peroxidasa (1:250 de la dilución de anticuerpo). Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, para después, y tras realizar lavados con 0.05% de Tween 20 en BBS, añadir el sustrato (TMB). La reacción se detuvo con ácido fosfórico 1M, cuando la curva patrón tuvo una coloración gradual. La lectura de absorbancia se realizó con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm empleando el filtro de 650 nm como referencia. Los resultados fueron procesados con el programa DeltaSoft PC.

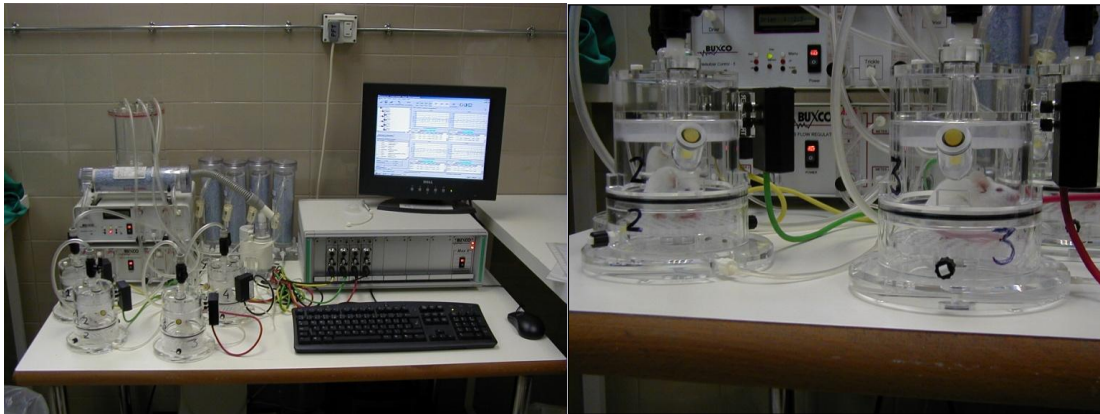
#### **2.5.2.2 IL-5 e IL-10**

Se incubaron los anticuerpos de captura de IL-5 (1 µg/ml en tampón carbonato a pH 9'6) o de IL-10 (5 µg/ml en PBS) durante una noche a 4°C. Se lavaron las placas con 0.05% de Tween 20 en BBS, y se añadió la solución de bloqueo (1% BSA en PBS para IL-5, 5% BSA en PBS para IL-10) que se mantuvo durante 2 horas a 37°C. Se añadieron los sobrenadantes de esplenocitos y cantidades conocidas de citocinas para la curva patrón (diluciones seriadas 1:3 a partir de 20ng/ml para IL5 e IL-10), y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Tras lavar las placas con 0.05% de Tween 20 en BBS, se añadieron los anticuerpos de detección anti-IL-5 (1:2000) o anti-IL-10 (1:1000) en 1% BSA en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas y se añadió estreptavidina-peroxidasa (1:2000 1% BSA en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras realizar lavados, se añadió el sustrato TMB. La reacción se detuvo con ácido fosfórico 1 M cuando los estándares seriados tuvieron una coloración gradual. La absorbancia se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm empleando el filtro de 650 nm como referencia. Los resultados fueron procesados con el programa DeltaSoft PC.

## 2.6 ESTUDIO NO INVASIVO DE LA FUNCION PULMONAR

Para el estudio de la función pulmonar se utilizó un sistema de pletismografía corporal total (Buxco Electronics, Troy, NuevaYork, EE.UU.) que permite analizar la función pulmonar del animal, sin necesidad de ser previamente intubado ni inmovilizado. Es un método no invasivo, que permite medir diferentes parámetros ventilatorios, entre ellos la hiperreactividad bronquial del animal, que se encuentra consciente y respirando espontáneamente.

El pletismógrafo consta de cuatro cámaras que contienen a los ratones, cámaras de referencia, y transductor de presión. Además el sistema incluye un procedimiento de aerosolización (modelo AUT 1820), de registro (MAX II 1320) y de análisis informático (Biosystem XA para Windows, versión 2.5) de los cambios de presión de la vía aérea de los animales que se originan dentro de las cámaras donde se encuentran emplazados (Figura 14).



*Figura 14. Sistema de pletismografía corporal total y detalle de las cámaras de inhalación del pletismógrafo.*

Las medidas son la diferencia de presión entre la cámara principal que contiene al ratón y la cámara de referencia. Esta diferencia de presión se crea por los cambios en el volumen y presión en la cámara principal durante el ciclo respiratorio del animal. Un

neumotacógrafo con una resistencia definida en la pared de la cámara principal actúa como un filtro de bajo paso y permite la compensación térmica.

Los cambios de presión pulmonar en la vía aérea del ratón, que reflejan el grado de obstrucción de la misma, se cuantifican mediante un parámetro denominado “Penh”. Este se obtiene de forma automatizada, mediante la siguiente relación (figura 15):

$$\text{Penh} = (\text{Te}/\text{Tr}-1) * \text{PEF}/\text{PIF}$$

Donde:

- Ti es el tiempo inspiratorio, que se define como el tiempo desde el inicio de la inspiración hasta el final de la misma.
- Te es el tiempo espiratorio, que se define como el tiempo desde el final de la inspiración hasta el principio de la siguiente inspiración
- Tr es el tiempo de relajación, que es el tiempo durante el que la presión desciende un 36% respecto a la presión espiratoria total
- Te/Tr-1 corresponde a la pausa
- PEF es el pico flujo espiratorio (ml/s) es la máxima presión positiva durante una respiración
- PIF es el pico flujo inspiratorio (ml/s) es la máxima presión negativa durante una respiración.

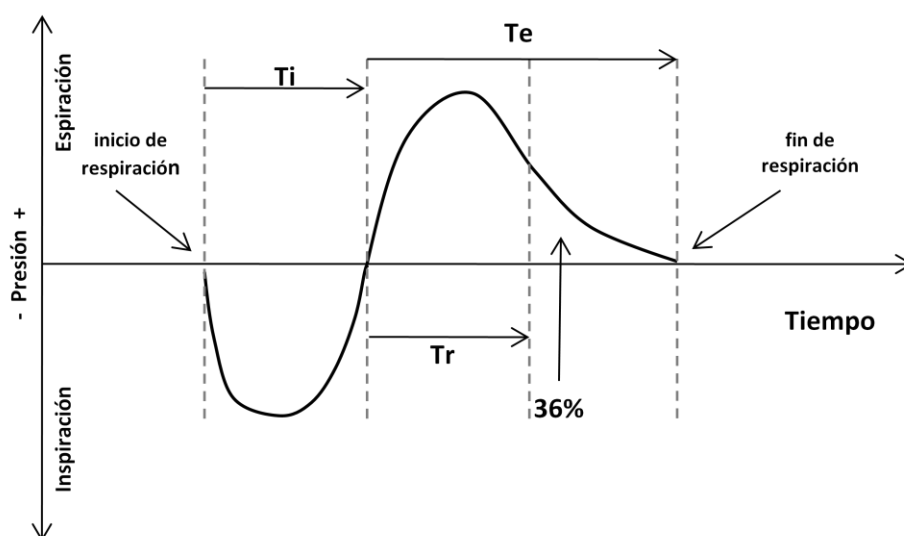


Figura 15. Parámetros medidos por el pletismógrafo. Esquema de la onda de presión en inspiración y espiración. Modificado de Hamelmann y cols (111).

Los animales se colocaron en las cámaras principales, comenzando con un período de aclimatación del animal en la cámara durante 5 minutos. Posteriormente se registraron medidas de los flujos respiratorios durante tres minutos. Este valor se consideró como la situación basal del animal. Después, mediante un nebulizador ultrasónico (PLY1040), se iniciaron las nebulizaciones, estableciendo un flujo constante de 1 l/min, de forma simultánea en las cuatro cámaras independientes (PLY3211, versión 2.1). Lo primero que se nebulizó fue el diluyente de la metacolina (PBS), este valor sirve para cuantificar el posterior incremento del Penh tras la inhalación de metacolina. Posteriormente se nebulizaron concentraciones crecientes de metacolina, desde 3 mg/ml hasta 48 mg/ml durante dos minutos de tiempo. Los cambios de presión en la vía aérea fueron registrados durante los tres minutos siguientes a la administración de cada dosis mediante un neumotacógrafo que transmitió la señal a un analizador informático.

La hiperreactividad bronquial se midió como la relación entre Penh correspondiente a cada dosis de metacolina respecto al Penh obtenido en cada ratón tras la inhalación de PBS (111).

## **2.7 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LOS PULMONES**

Tras el sacrificio de los ratones se extrajo el lóbulo inferior derecho del pulmón y se fijó con paraformaldehído al 4% en PBS. Posteriormente, fueron deshidratados en soluciones de etanol de concentración creciente (50%, 70%, 80%, 96% y 100%), durante 2-4 horas. A continuación, fueron sumergidos en xileno durante 1 hora, y, finalmente embebidos en parafina (Sigma, St. Louis, EEUU) a 60 °C. Los bloques de parafina fueron cortados en un microtomo (Leica, Wetzlar, Alemania) en secciones de 10 µm de grosor en orientación transversal y éstas fueron adheridas a los portaobjetos. Para el estudio histopatológico de los pulmones se realizaron dos técnicas: tinción de hematoxilina-eosina (HE), para evaluar el grado de infiltración celular, y tinción con el reactivo de Schiff (PAS), para visualizar mucina y células productoras de moco. Estas técnicas fueron realizadas por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

### **2.7.1 TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA**

Las secciones de parafina, tras ser desparafinadas en dos baños de xilol durante 5 minutos, se rehidrataron en una serie de etanoles a concentración decreciente (100%, 96%, 80%, 70% y 50%), en períodos de 5 minutos, y posteriormente se sumergieron en agua destilada. Las secciones se tiñeron con una solución de hematoxilina durante 10 minutos. Después de lavarlas con agua destilada durante 5 minutos, las muestras se tiñeron con 1% de eosina durante 4 minutos y se sumergieron 1 minuto en agua destilada. A continuación las secciones se diferenciaron (1% de ácido acético en etanol al 70% durante 1 minuto) y se deshidrataron en etanoles de concentraciones crecientes, 5 minutos cada uno y en xilol 10 minutos, y se montaron con el medio de montaje Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemania). Las secciones fueron estudiadas con un microscopio Olympus CK40 (Tokio, Japón) y fotografiadas con una cámara digital Olympus DP11 (Tokyo, Japón) adaptada al microscopio.



La intensidad de la inflamación peribronquial y perivascular fue valorada de forma semicuantitativa utilizando el siguiente sistema de puntuación: 0, tejido sin presencia de células inflamatorias; 1, pocas células inflamatorias; 2, anillo de células inflamatorias de 1 capa celular de grosor; 3, anillo de células inflamatorias de 2-4 capas celulares de grosor; 4, anillo de células inflamatorias de más de 4 capas celulares de grosor (112-113).

### **2.7.2 TINCIÓN CON ÁCIDO PERIÓDICO Y REACTIVO DE SCHIFF**

Parte de las secciones pulmonares fueron desparafinadas en xileno, rehidratadas con agua destilada y oxidadas en una solución de ácido periódico al 5% durante 5 minutos. Tras lavar en agua destilada las secciones, se sumergieron en solución del reactivo de Schiff durante 15 minutos. A continuación, los cortes fueron lavados con agua destilada durante 10 minutos, y se procedió a la tinción con hematoxilina. Se lavaron con agua destilada, y, por último, se deshidrataron con etanol en concentraciones crecientes y se montaron con Entellan®. Las secciones fueron fotografiadas con una cámara Olympus DP11, adaptada al microscopio Olympus CK40.

La puntuación para evaluar la cantidad de células que contienen moco PAS positivo presentes en la vía aérea se determinó de la siguiente forma: 0 (<0.5% de células PAS positivas), 1 (de 5-25%), 2 (de 25-50%), 3 (de 50-75%), 4 (>75%) (112-113).

### **2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRESENTACIÓN DE LOS DATOS**

Los resultados son expresados como la media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (EEM), en UA/ml en el caso de las inmunoglobulinas y en pg/ml las citocinas.

La medida de la obstrucción de la vía aérea se reflejó como la relación entre el Penh correspondiente a cada dosis de metacolina inhalada respecto al Penh obtenido en

cada ratón tras la inhalación de PBS, también expresado en los resultados como la media  $\pm$  EEM.

La significación estadística de los resultados se estimó mediante el programa informático SPSS por el test ANOVA de 1 factor. Las comparaciones dos a dos se estimaron en función de la homogeneidad de las varianzas por los test de Bonferroni o Games-Howell. Fueron considerados significativos aquellos valores con  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

## **1. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ADYUVANTES ASOCIADOS A POLEN DE *OLEA EUROPAEA* EN RATONES SANOS**

Para estudiar el efecto de la administración de polen de *O. europaea* junto con un adyuvante se dividió a los ratones en grupos homogéneos, a los que se administró 3 dosis, con un intervalo semanal de los diferentes tratamientos del estudio: olea+aluminio, olea+fosfato cálcico, olea+MPL y olea+ISS. Como control se utilizó un grupo de ratones al que se administró olea-suero salino y otro grupo que recibió exclusivamente suero salino. Después de la administración de los tratamientos, se realizó una provocación nasal con polen de olea a todos los ratones, para estudiar así la respuesta inmune primaria y comparar los diferentes grupos de tratamiento.

Se realizaron extracciones sanguíneas para obtener suero para la determinación de inmunoglobulinas en tres ocasiones: basal, después de la administración de los tratamientos y después de la provocación nasal con olea. Tras esta provocación nasal, se realizaron las pruebas funcionales respiratorias (no invasivas) y posteriormente se sacrificó a los ratones para poder determinar las citocinas del cultivo del sobrenadante de esplenocitos y estudiar la histología pulmonar.

Se estudió por tanto la respuesta inmune primaria (mediante la determinación de inmunoglobulinas y citocinas mediante método ELISA), la hiperreactividad bronquial y la histología pulmonar. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

### **1.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE PRIMARIA**

#### **1.1.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL**

Para comparar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la respuesta inmunológica en ratones sanos, e intentar determinar si alguno de ellos produce una desviación hacia la vía Th1 o Th2 se realizaron determinaciones seriadas de IgG1 (indica respuesta Th2) y de IgG2a (indica respuesta Th1).

### 1.1.1.1 DETERMINACIÓN DE IgG1 ESPECÍFICA

La IgG1 se determinó mediante método ELISA, y fue indetectable para todos los ratones en la determinación basal. En la semana 4, tras la administración de los diferentes tratamientos, todos los grupos de ratones, excepto el salino, produjeron IgG1. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos, por tanto todos los ratones tratados con olea más un adyuvante produjeron una respuesta Th2. Al realizar la determinación de IgG1 tras la provocación nasal con olea (semana 5), a pesar de que todos los grupos aumentaron la producción de IgG1, los ratones tratados con olea-aluminio produjeron una cantidad de IgG1 significativamente mayor que el grupo de ratones tratados con olea+ISS, olea+salino y el grupo control (salino). Los resultados se detallan en la tabla 1 y se representan en la fig. 16.

IgG1 (UA/ml)			
GRUPO	Semana 0	Semana 4	Semana 5
Olea+ISS	0 ± 0	333 ± 250	1513 ± 658
Olea+MPL	0 ± 0	3772 ± 1665	7633 ± 3312
Olea+F. cálcico	0 ± 0	4972 ± 3143	9393 ± 3940
Olea+Aluminio	0 ± 0	2426 ± 1091	19090 ± 7420**
Olea+Salino	0 ± 0	370 ± 172	1172 ± 330
Salino+Salino	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Tabla 1: Determinación seriada de IgG1 basal y después de las intervenciones (semana 4 después de tratamiento y semana 5 después de provocación nasal con olea). El grupo de ratones al que se le administró Olea con hidróxido de aluminio produce mayor cantidad de IgG1 con una significación de \*\* $p < 0.01$ . Los valores se estudiaron mediante el test ANOVA y se representan como media  $\pm$  EEM.

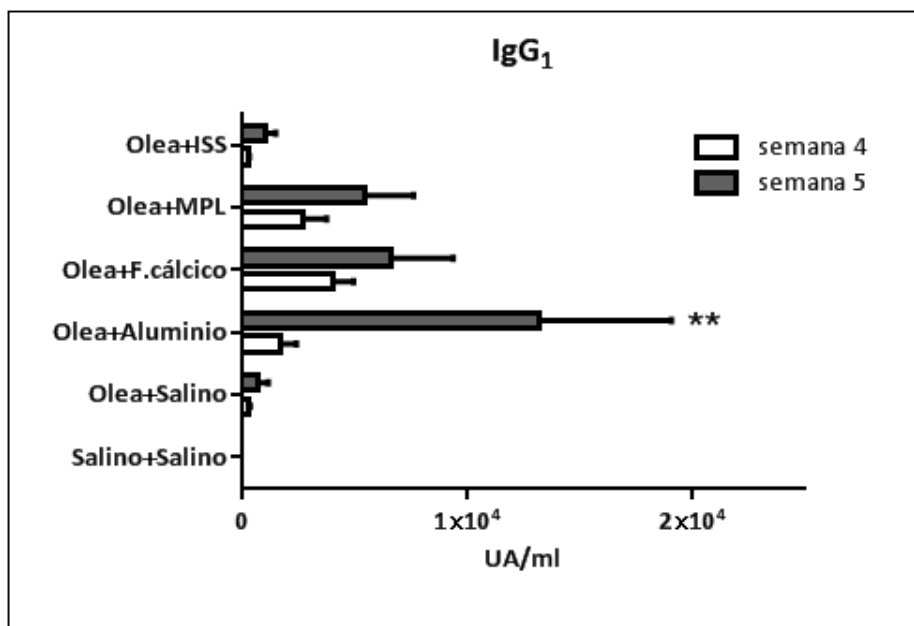


Figura 16: Producción de IgG1 en las semanas 4 y 5. Se observa como el grupo de ratones tratados con Olea e hidróxido de aluminio, después de la provocación nasal produce una mayor cantidad de IgG1 (\*\* $p < 0.01$ ), lo que indica una mayor respuesta Th2.

#### 1.1.1.2 DETERMINACIÓN DE IgG2a ESPECÍFICA

Para estudiar el efecto humoral sobre la vía Th1 de la administración de diferentes adyuvantes junto con *O. europea* en ratones sanos, se realizaron determinaciones seriadas de IgG2a: basal, después de las tres dosis de inmunoterapia y después de la provocación nasal con polen de olea. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 2.

IgG2a (UA/ml)			
GRUPO	Semana 0	Semana 4	Semana 5
Olea+ISS	0 ± 0	56118 ± 30614*	161520 ± 67339**
Olea+MPL	0 ± 0	6319 ± 889*	6976 ± 1113**
Olea +F. cálcico	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Olea+Aluminio	0 ± 0	1043 ± 1143	2386 ± 1662
Olea+Salino	0 ± 0	370 ± 172	1172 ± 330
Salino+Salino	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Tabla 2: Determinaciones seriadas de IgG2a. Los valores se representan como la media ± EEM. Los resultados se analizaron mediante el test ANOVA, obteniéndose diferencias significativas para la producción de IgG2a por los ratones tratados con Olea+ISS y Olea+MPL en la semana 4 (\* $p < 0.05$ ) y en la semana 5 (\*\* $p < 0.01$ ).

Ninguno de los ratones produjo IgG2a de forma basal. Después de la administración de los tratamientos (semana 4), los grupos tratados con Olea+ISS y Olea+MPL produjeron una cantidad de IgG2a mayor que el resto de tratamientos, alcanzando significación estadística con  $p < 0.05$  (figura 17).

En la semana 5, después de la provocación nasal, el grupo de ratones tratados con Olea e ISS produjo una cantidad de IgG2a mayor que el resto de grupos y el grupo de ratones tratados con MPL fue capaz de producir mayor cantidad de IgG2a que los tratados con Olea y Fosfato cálcico o suero salino, y que el grupo tratado exclusivamente con suero salino. Estos resultaron estadísticamente significativos, con  $p < 0.01$  (figura 17).

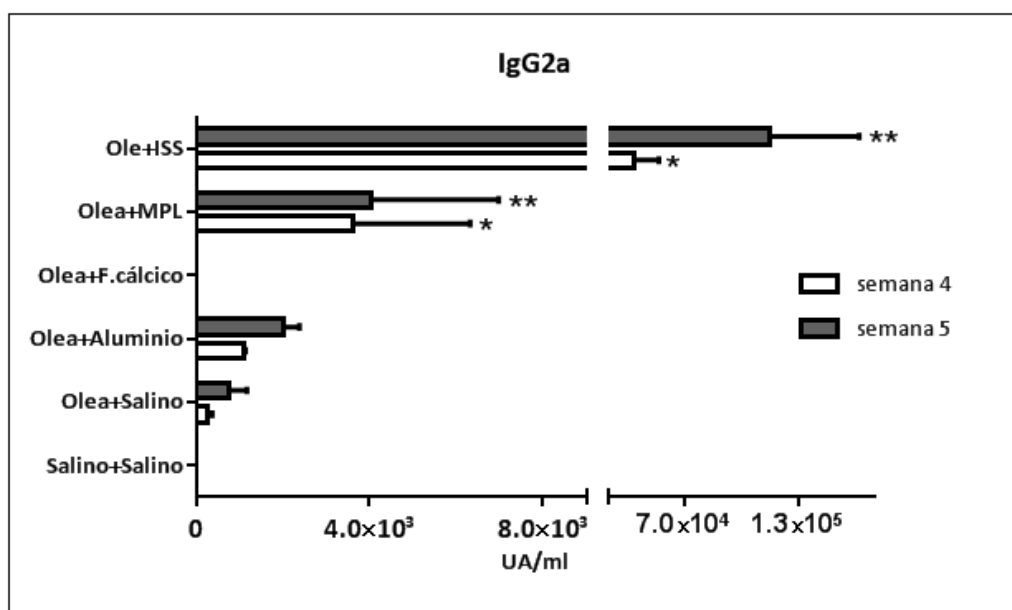


Figura 17: Producción de IgG2a específica en las semanas 4 y 5 para los diferentes tratamientos. Los ratones tratados con Olea+ISS produjeron una cantidad de IgG2a mayor que el resto de grupos de tratamiento, con una significación estadística de  $*p<0.05$  y  $**p<0.01$  para las semanas 4 y 5 respectivamente. El grupo que recibió Olea+-MPL también produce gran cantidad IgG2a, tanto en la semana 4 ( $*p<0.05$ ) como en la 5 ( $**p<0.01$ ).

### 1.1.2 SECRECIÓN DE CITOCINAS EX VIVO

Para estudiar el perfil de citocinas que produjeron los diferentes grupos de tratamientos en ratones sanos, se realizaron determinaciones de IL-4 e IFN- $\gamma$ . La cuantificación de citocinas se realizó mediante método ELISA, tras sacrificar a los ratones y cultivar sus esplenocitos durante 72 h, estimulándolos durante este tiempo con polen de *Olea europaea*.

#### 1.1.2.1 SECRECIÓN DE IL-4 ESPECÍFICA

La determinación de IL-4 se utilizó para estudiar del efecto de los diferentes tratamientos sobre la respuesta inmune tipo Th2. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 3.



IL-4	
GRUPO	pg/ml
Olea+ISS	0 ± 0
Olea+MPL	0 ± 0
Olea +F. cálcico	6,4 ± 6,4
Olea+Aluminio	5,3 ± 5,3
Olea+Salino	0 ± 0

Tabla 3. Producción ex vivo de IL-4 específica por esplenocitos de ratones sanos, tras administración de diferentes adyuvantes junto con *O. europaea*. Los valores se expresan como la media ± EEM.

Se detectó producción de IL-4 sólo en los ratones que habían sido tratados con olea más aluminio o fosfato cálcico. A pesar de que los datos no alcanzaron significación estadística, parece que estos tratamientos (hidróxido de aluminio y fosfato cálcico) tendrían tendencia a inducir la respuesta inmunológica Th2, y no sería así para los derivados bacterianos, ya que los ratones sanos tratados con Olea+ISS u Olea+ MPL no produjeron IL-4 (figura 18).

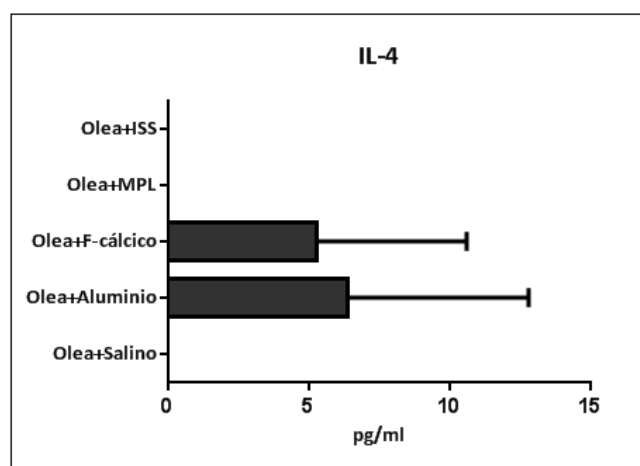


Figura 18: Representación gráfica de la producción de IL-4 específica por ratones sanos a los que se les administra *Olea europaea* más un adyuvante.

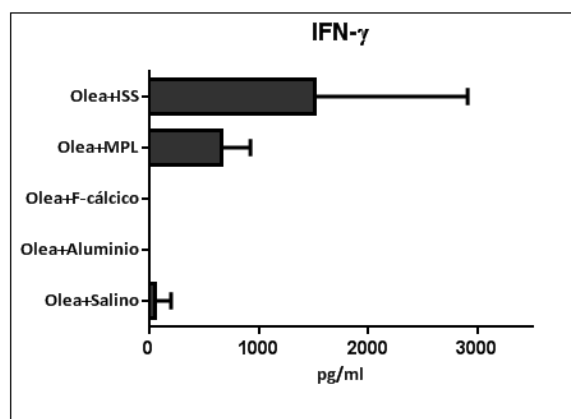
### 1.1.2.2 SECRECIÓN DE IFN- $\gamma$ ESPECÍFICA

Para estudiar el efecto sobre la vía Th1 de la administración un adyuvante más polen de *O. europaea* en ratones sanos, se realizaron determinaciones de IFN- $\gamma$ . Los resultados se exponen en la tabla 4.

IFN- $\gamma$	
GRUPO	pg/ml
Olea+ISS	1509 $\pm$ 1399
Olea+MPL	666 $\pm$ 259
Olea +F. cálcico	0 $\pm$ 0
Olea+Aluminio	0 $\pm$ 0
Olea+Salino	55 $\pm$ 144

Tabla 4. Producción *ex vivo* de IFN- $\gamma$  por esplenocitos de ratones, que eran previamente sanos, tras administración de Olea más diferentes adyuvantes. Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM.

Los valores más elevados de IFN- $\gamma$  fueron los producidos por los grupos que habían recibido Olea con ISS o MPL. A pesar de que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, existe una tendencia por parte de los ratones tratados con derivados bacterianos (olea+ISS y olea+MPL) a producir citocinas Th1, mayor que en el resto de grupos (figura 19).



Figuras 19: Representación gráfica de la producción de IFN- $\gamma$  por ratones sanos a los que se les administra Olea más un adyuvante.

## 1.2 ESTUDIO NO INVASIVO DE LA FUNCIÓN RESPIRATORIA MEDIANTE PLETISMOGRAFÍA CORPORAL TOTAL

El efecto que produce sobre la hiperreactividad bronquial, la administración de un adyuvante más *O. europaea* en ratones sanos, se evaluó de forma no invasiva. La pletismografía se realizó 24 y 48 horas después de la provocación nasal con Olea. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 5:

% Penh PBS						
Concentración metacolina	Olea+Salino	Olea+Aluminio	Olea+F.cálcico	Olea+MPL	Olea+ISS	Salino+Salino
Basal	96 ± 6	107 ± 12	92 ± 4	83 ± 3	83 ± 4	105 ± 8
PBS	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
3 mg/ml	145 ± 14	181 ± 18	156 ± 6	175 ± 15	171 ± 17	139 ± 5
6 mg/ml	180 ± 16	264 ± 25	246 ± 36	242 ± 15	222 ± 10	192 ± 25
12 mg/ml	271 ± 49	442 ± 77	388 ± 56	328 ± 29	339 ± 46	227 ± 25
24 mg/ml	418 ± 100	591 ± 101	462 ± 37	444 ± 45	496 ± 99	246 ± 18

Tabla 5. Resultados obtenidos al realizar pletismografía corporal total a los ratones sanos, tras recibir 3 dosis de olea más un adyuvante y tras la realización de provocación nasal con polen de *O. europaea*. Los datos se expresan mediante el parámetro Penh, que cuantifica los cambios de presión pulmonar en la vía aérea del ratón y se presentan como la media ± EEM

A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos, parece existir una tendencia a presentar mayor hiperreactividad bronquial por parte de los ratones que recibieron Olea con algún adyuvante o suero salino, especialmente hidróxido de aluminio, frente a los ratones que no reciben ningún tratamiento. Estos resultados se representan en la figura 20.

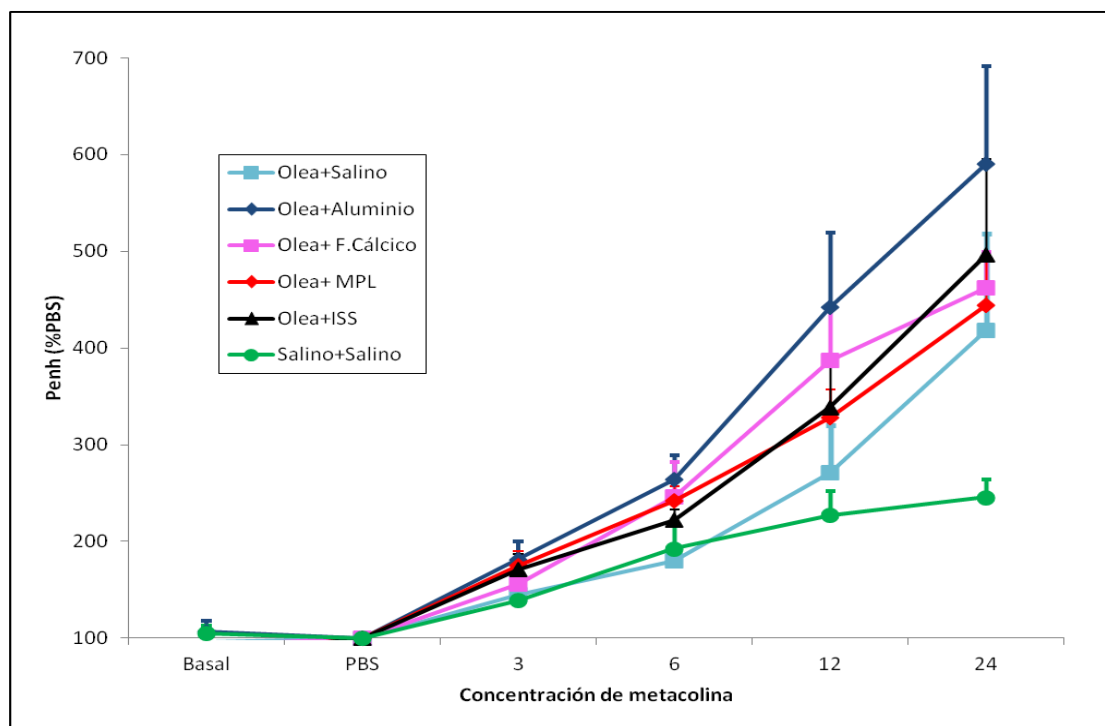


Figura 20. Prueba de metacolina en ratones sanos que reciben un adyuvante más *O. europaea*. No hay diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento.

### 1.3 ESTUDIO DE LA HISTOLOGÍA PULMONAR: INFILTRADOS CELULARES Y SECRECIÓN DE MOCO

Tras el sacrificio de los ratones a los que previamente se había administrado tres dosis de tratamiento con olea y suero o adyuvante, y realizado la provocación nasal con olea, se obtuvieron las secciones pulmonares. En estas secciones se realizaron dos tipos de tinción: se utilizó hematoxilina-eosina para estudiar la presencia de infiltrados celulares inflamatorios en el parénquima pulmonar, tanto peribronquiales como perivasculares; mediante la tinción PAS se evaluó el grado de hipersecreción en la luz bronquial, determinado por la presencia de moco y de las células que lo producen.

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 6 y se representan en la figura 21.

HISTOLOGIA PULMONAR		
GRUPO	Inflamación pulmonar	Secreción moco
Olea+ISS	$2 \pm 0^*$	$0,5 \pm 0,2$
Olea+MPL	$2 \pm 0,4^*$	$1 \pm 0,4$
Olea+F.cálcico	$1,5 \pm 0,2^*$	$1,5 \pm 0,7$
Olea+Aluminio	$3 \pm 0,4^*$	$2 \pm 0,9^*$
Olea+Salino	$2 \pm 0^*$	$0,3 \pm 0,2$
Salino+Salino	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$

Tabla 6: Valores obtenidos en la cuantificación en cortes pulmonares de infiltrados inflamatorios peribronquiales y perivasculares en las secciones teñidas con hematoxilina-eosina y células PAS positivo (secretoras de moco). La inflamación fue valorada de forma semicuantitativa utilizando un sistema de puntuación: 0, normal; 1, pocas células; 2 anillo de células inflamatorias de 1 capa celular de grosor; 3 anillo de células inflamatorias de 2-4 capas celulares de grosor; 4 anillo de células inflamatorias de más de 4 capas celulares de grosor. La puntuación para evaluar la cantidad de células que contienen moco PAS positivo presentes en la vía aérea se determinó de la siguiente forma: 0, <0.5% de células PAS positivas, 1, de 5-25%; 2, de 25-50%; 3, de 50-75%; 4, >75%. Los valores se expresan mediante la media  $\pm$  EEM. Se consideraron significativos los valores con  $*p < 0,05$ .

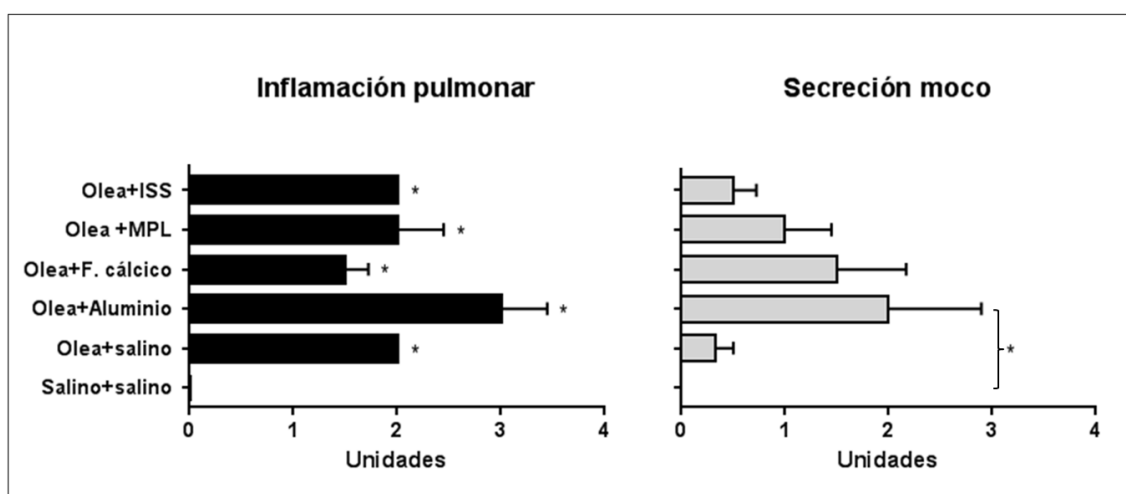
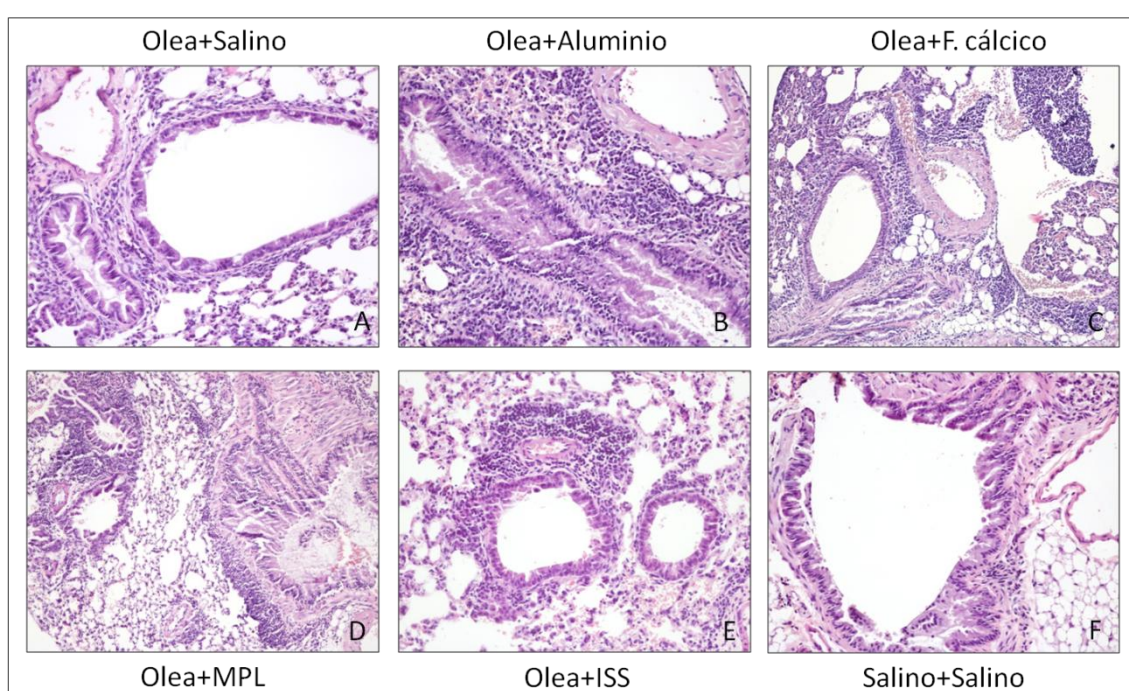


Figura 21. Cuantificación de inflamación y células PAS positivo en secciones pulmonares de ratones sanos que recibieron tres dosis de tratamiento con olea y diferentes adyuvantes.

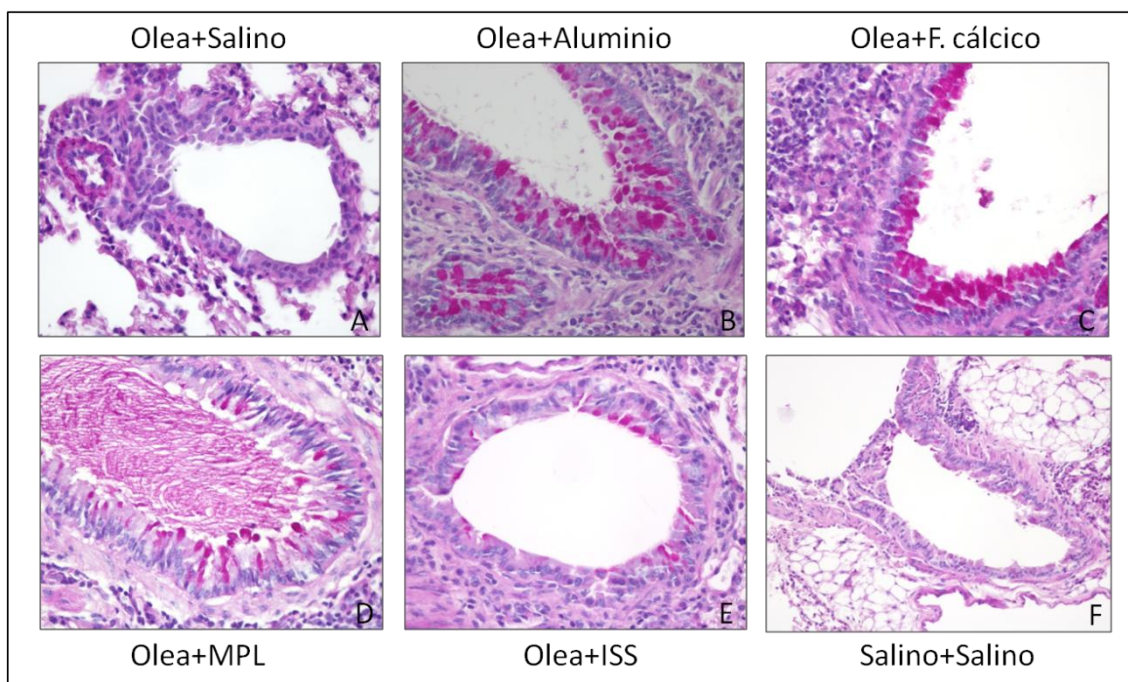
Los grupos de ratones que recibieron olea con suero salino o cualquiera de los adyuvantes del estudio, presentaron una cantidad de infiltrados peribronquiales y perivasculares significativamente mayor que los controles sanos, lo que indica la presencia de cierto grado de inflamación pulmonar tras la administración de olea. Esta inflamación tendió a ser mayor en los que recibieron hidróxido de aluminio como adyuvante, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de tratamiento (figura 22 A-F).



*Figura 22. Examen histológico del tejido pulmonar mediante tinción hematoxilina-eosina, para el estudio de inflamación pulmonar. Se muestran cortes representativos de cada uno de los grupos del estudio. Los ratones que recibieron olea junto con suero salino u adyuvante (A-E) presentan cierto grado de inflamación, aunque sin encontrar diferencias significativas entre diferentes grupos de tratamiento (aumentos A, B, E y F 200x, C y D 100X)*

En cuanto a la tinción PAS, los ratones que recibieron olea junto con hidróxido de aluminio, presentaron una producción de moco significativamente mayor que los ratones sanos (salino + salino). El resto de grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas al hacer las comparaciones dos a dos. No obstante, los grupos tratados con hidróxido de aluminio o fosfato cálcico presentaron una tendencia

a mayor secreción de moco que aquellos que recibieron olea junto con MPL o ISS, y todos ellos más que el grupo control de ratones sanos (salino + salino) (figura 23 A-F y figura 21).



*Figura 23. Examen histológico del tejido pulmonar mediante tinción PAS, para estudio de la producción de moco. Se muestran cortes representativos de cada uno de los grupos del estudio. Destaca la mayor producción de moco por parte de los ratones que recibieron tres dosis de olea junto con hidróxido de aluminio (B). (Aumentos A-F 200X).*

## 2. EFECTO SISTÉMICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN ALÉRGENO, POLEN DE *OLEA EUROPAEA*, ASOCIADO A HIDRÓXIDO DE ALUMINIO

Los ratones fueron sensibilizados con extracto crudo de polen de *O. Europaea*. Esto se realizó administrando inyecciones por vía subcutánea que contenían olea en hidróxido de aluminio, durante tres semanas consecutivas. El efecto de esta administración se estudió desde el punto de vista inmunológico (realizando determinaciones de IgG1) y de función pulmonar.

### 2.1 EFECTO INMUNOLÓGICO: DETERMINACION DE IgG1 ESPECÍFICA

Se recogieron muestras sanguíneas basales y, después de la última dosis sensibilizante, se estudió la dinámica de la respuesta inmune humoral, tipo Th2, mediante la cuantificación de la concentración de anticuerpos IgG1 específicos frente a *Olea europaea*. Los resultados se exponen en la tabla 7.

IgG1 (UA/ml)		
GRUPO	Semana 0	Semana 4
Sensibilizados	34 ± 15	9664 ± 173**
Controles	40 ± 21	86 ± 11

Tabla 7: Producción de IgG1 sérica específica frente a olea en ratones sensibilizados polen de olivo y en los controles. Los valores se expresan en U/ml y se representan como la media ± error estándar de la media. La significación estadística fue de \*\* $p < 0,01$  del grupo tratado con e hidróxido de aluminio vs. salino

A nivel basal se observó una producción mínima de IgG1 específica. En la semana 4, se detectó una producción de IgG1 significativamente mayor en todos los ratones que habían recibido olea junto con hidróxido de aluminio, que en aquellos que recibieron exclusivamente suero salino (grupo control) (figura 24).



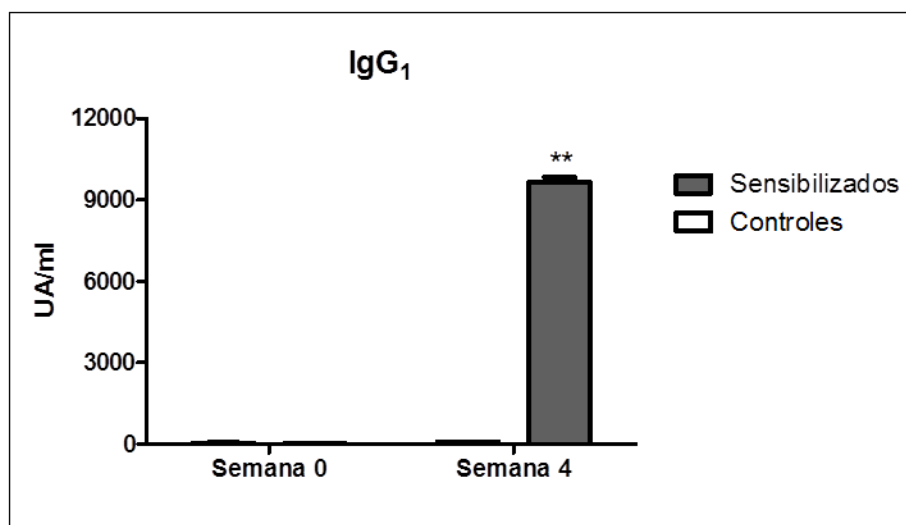


Figura 24: Producción de IgG1 en ratones antes (semana 0) y después (semana 4) de la sensibilización a polen de *O. europaea* mediante la inyección de 3 dosis de olea adsorbido en hidróxido de Aluminio. Los ratones sensibilizados producen una cantidad de IgG1 significativamente mayor que los controles.

Los ratones sensibilizados a polen de olivo, se repartieron en 5 grupos. Cada uno de estos grupos recibiría posteriormente un tratamiento con inmunoterapia específica diferente. Se midió la cantidad media de IgG1 que había producido en la semana 4 cada uno de estos grupos, y se redistribuyeron para conseguir una distribución homogénea y asegurar que los grupos eran comparables. Los valores se exponen en la tabla 8, presentado todos los grupos de valores sensibilizados a polen de *O. europaea* una producción media de IgG1 específica similar (figura 25).

IgG1	
GRUPO	UA/ml
Olea+ISS	9985 ± 772
Olea+MPL	9031 ± 2001
Olea+F.cálcico	9813 ± 1140
Olea+Aluminio	9570 ± 1383
Olea+Salino	9922 ± 1462
Salino+Salino	91 ± 11

Tabla 8: Determinaciones séricas de IgG1 específica en la semana 4, después de haber recibido 3 dosis de olea + hidróxido de aluminio. Se procedió a la homogeneización de los grupos terapéuticos respecto a la concentración de IgG1. Los valores se expresan mediante la media ± EEM.

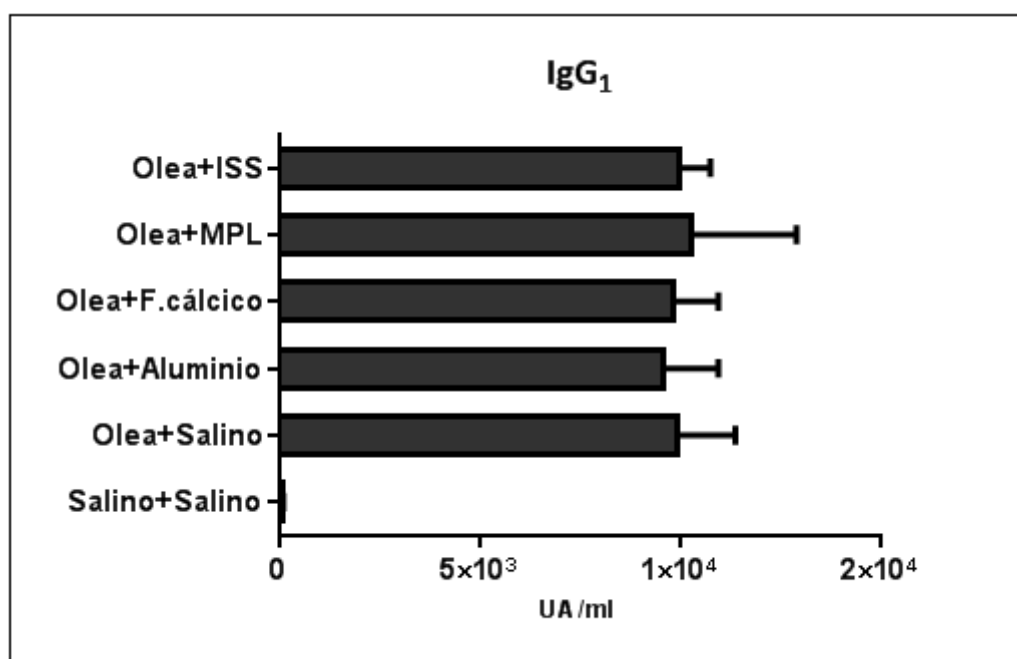


Figura 25: Distribución de grupos según niveles de IgG1 tras la sensibilización a polen de olivo, antes de administrar tratamiento con inmunoterapia (semana 4). Se comprueba que no existen diferencias entre los grupos de ratones alérgicos previo a la administración de la inmunoterapia.

## 2.2 EFECTO SOBRE LA FUNCION RESPIRATORIA: HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL

En la semana 5, y tras la realización de una provocación nasal con olea, se realizó un estudio no invasivo de hiperreactividad bronquial en los ratones, mediante pletismografía corporal total. El grupo de ratones que habían recibido las tres dosis de olea junto con hidróxido de aluminio y, por tanto, estaban sensibilizados a olea, presentó una hiperreactividad bronquial significativamente mayor que los controles. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 9.

Concentración metacolina	% Penh PBS	
	Sensibilizados	Controles
Basal	96 ± 1	96 ± 2
PBS	100 ± 0	100 ± 0
3 mg/ml	141 ± 3*	124 ± 6
6 mg/ml	189 ± 9*	147 ± 13
12 mg/ml	254 ± 20*	170 ± 16
24 mg/ml	298 ± 26*	198 ± 25

*Tabla 9: Resultados de la pletismografía corporal total realizada a los ratones en la semana 5 del experimento. Los ratones que fueron sensibilizados a olivo presentan una hiperreactividad bronquial significativamente mayor que los ratones sanos (\*p<0.05) para todas las concentraciones de metacolina. Los resultados se expresan como media ± EEM*

Los resultados se representan en la figura 26:

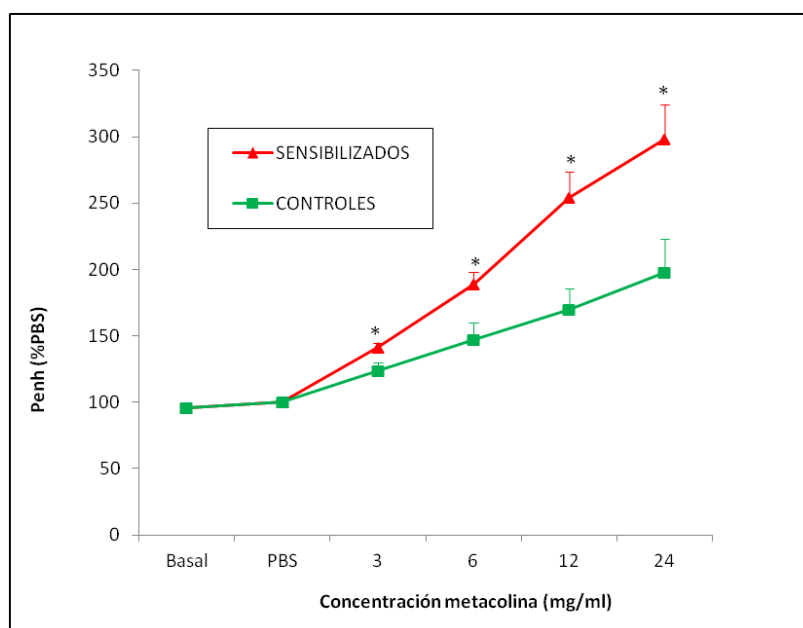


Figura 26: Representación gráfica de la pleetismografía corporal total realizada a los ratones para comprobar el empeoramiento de la función respiratoria tras la sensibilización a polen de *Olea europaea*. Los ratones sensibilizados presentaron una hiperreactividad bronquial (cuantificada con el parámetro Penh) significativamente mayor que los controles.

Con los resultados obtenidos desde el punto de vista inmunológico (IgG1 específica) y funcional respiratorio (hiperreactividad bronquial) tras la administración de tres dosis s.c. de olea e hidróxido de aluminio, comprobamos que habíamos conseguido un buen modelo de inflamación pulmonar para evaluar el efecto de diferentes tratamientos sobre estos ratones sensibilizados a *O. europaea*.

### **3. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ADYUVANTES ASOCIADOS A UN ALÉRGENO EN RATONES SENSIBILIZADOS A POLEN DE *OLEA EUROPAEA***

#### **3.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE SECUNDARIA**

Una vez comprobado el efecto Th2 que ejerce la administración de olea en hidróxido de aluminio, y por tanto, habiendo comprobado que todos los ratones se encontraban sensibilizados a olivo, se planteó si dicho efecto se modificaría tras la administración del alérgeno (polen de *Olea europaea*) junto con un adyuvante.

Para ello, los ratones fueron divididos en grupos homogéneos (n=7-8) y se les administraron los distintos adyuvantes junto con olea: hidróxido de aluminio, fosfato cálcico, MPL e ISS. Como grupo control se utilizó un grupo de ratones sensibilizados a polen de olivo al que se le administró posteriormente suero salino s.c., es decir ratones sensibilizados que no reciben tratamiento activo. Esto se realizó durante tres semanas consecutivas, y posteriormente se recogió una muestra sanguínea para determinar Inmunoglobulinas séricas específicas. Una vez recogida esta muestra, se procedió al sacrificio de los ratones, con el fin de obtener esplenocitos, que fueron cultivados durante 72 horas tras estimulación con polen de *O. europaea*. Mediante método ELISA, se realizaron determinaciones de algunas de las principales citocinas implicadas en la respuesta inmune alérgica. A continuación se describen los resultados obtenidos.

#### **3.1.1 DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS SÉRICAS ESPECÍFICAS**

##### **3.1.1.1 DETERMINACIÓN DE IgG1**

Se determinó la producción de IgG1 mediante el método ELISA, detectándose un aumento de IgG1 en todos los grupos de tratamiento. Sólo los ratones que no habían sido previamente sensibilizados a polen de olivo no aumentaron la producción de IgG1 tras la administración de los distintos tratamientos. Por tanto, la inmunización potenció la producción de IgG1 específica a olivo en todos los grupos de ratones sensibilizados a polen de olivo, independientemente del tratamiento recibido.

Los resultados se detallan en la Tabla 10 y se representan en la figura 27.

IgG1 (UA/ml)		
GRUPO	Semana 4	Semana 8
Olea+ISS	9984 ± 772	169633 ± 7232
Olea+MPL	9030 ± 2001	152001 ± 16383
Olea+F. cálcico	9813 ± 1140	177440 ± 27483
Olea+Aluminio	9570 ± 1383	182442 ± 23746
Olea+Salino	9921 ± 1462	132573 ± 7507
Salino+Salino	86 ± 11**	376 ± 78**

Tabla 10. Producción de IgG<sub>1</sub> después de la sensibilización a *O. europaea* (semana 4) y después de la administración de los distintos tratamientos (olea + adyuvante según grupo) (semana 8). Los resultados se expresan mediante la media ± EEM. Los ratones sanos a los que no se le administra tratamiento presentan una producción de IgG<sub>1</sub> menor que el resto de grupos ( $p < 0.01$ )

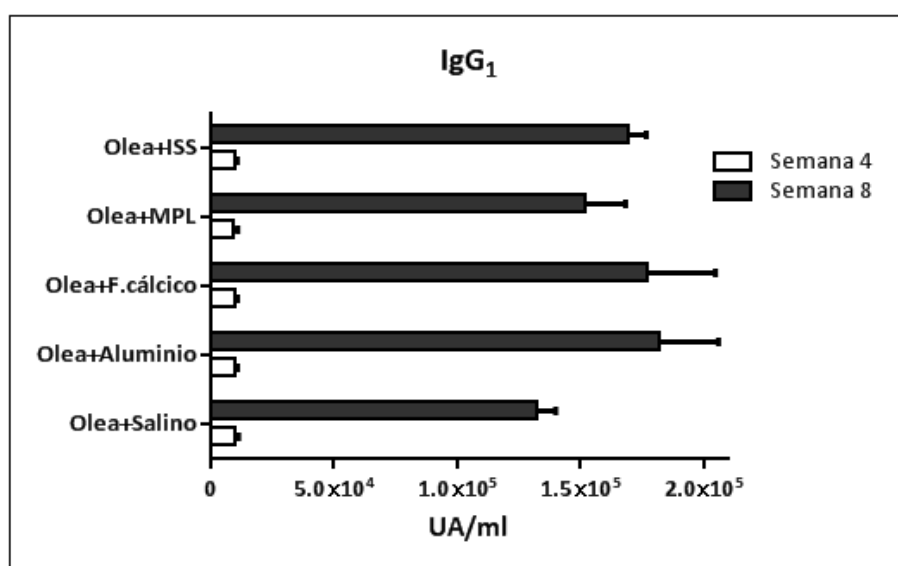


Figura 27. Producción de IgG<sub>1</sub> antes y después de la administración de los distintos tratamientos (olea + adyuvante según grupo). La semana 4 los ratones ya habían sido sensibilizados a olivo mediante la administración de olea e hidróxido de aluminio. En la semana 8 los ratones habían recibido tres dosis, con periodicidad semanal, de tratamiento (olea + adyuvante). A los ratones no tratados se les administró suero salino. Los resultados se expresan mediante la media ± EEM.

### 3.1.1.2 DETERMINACIÓN DE IgE

La IgE es marcador de la respuesta inmune humoral tipo Th2, por esta razón se realizaron determinaciones de IgE específica a *O. europaea*, mediante método ELISA, antes y después de la administración de los diferentes tratamientos. Los resultados se exponen en la tabla 11.

GRUPO	IgE (UA/ml)	
	Semana 4	Semana 8
Olea+ISS	10734 ± 893	18272 ± 1244**
Olea+MPL	7330 ± 923	23428 ± 1663*
Olea+F. cálcico	8717 ± 951	27229 ± 3898
Olea+Aluminio	11550 ± 757	44054 ± 1971
Olea+Salino	13953 ± 588	29205 ± 1343

Tabla 11. Producción de IgE después de la sensibilización a olivo (semana 4) y después de la administración de los distintos tratamientos (semana 8). Los resultados se expresan mediante la media  $\pm$  error estándar de la media. La significación estadística se estimó mediante ANOVA (\* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ ).

Los ratones alérgicos a olivo y posteriormente tratados con olea más ISS y MPL produjeron una cantidad de IgE menor que el resto de grupos. En el grupo de ratones al que se administró olea con hidróxido de aluminio se detectó una cantidad de IgE significativamente mayor que en el resto de grupos. Estos datos se representan en la figura 28.

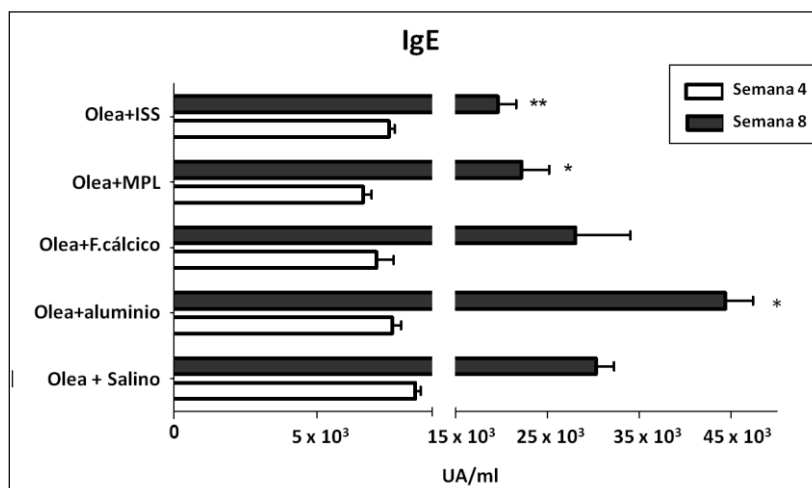


Figura 28. Producción de IgE antes y después de la administración de los distintos tratamientos (olea + adyuvante según grupo) La semana 4 los ratones estaban sensibilizados a polen de *O. europaea*, mientras que en la semana 8 los ratones habían recibido tres dosis, con periodicidad semanal, de tratamiento (olea + adyuvante). A los ratones no tratados se les administró suero salino.

### 3.1.1.3 DETERMINACIÓN DE IgG2a

El efecto sobre la actividad humoral de los adyuvantes sobre las vía Th1 de la respuesta alérgica, se evaluó mediante la medición de IgG2a específica. Las determinaciones de IgG2a se realizaron tras la sensibilización de los ratones a polen de *O. europaea* (semana 4) y tras la administración de los diferentes tratamientos. Los resultados se exponen en la tabla 12.

IgG2a (UA/ml)		
GRUPO	Semana 4	Semana 8
Olea+ISS	3734 ± 993	433272 ± 101244***
Olea+MPL	3330 ± 1023	20428 ± 2163
Olea+F. cálcico	4717 ± 351	15229 ± 2898
Olea+Aluminio	3550 ± 957	18054 ± 2571
Olea+Salino	12953 ± 3888	19205 ± 6843

Tabla 12. Producción de IgG2a después de la sensibilización a olivo (semana 4) y después de la administración de los distintos tratamientos (semana 8). Los resultados se expresan mediante la media ± EEM. La significación estadística se estimó por ANOVA y fue de \*\*\* $p < 0,001$  del grupo tratado con ISS.



Los ratones tratados con olea junto con ISS produjeron una respuesta de IgG2a específica mucho mayor que el resto de grupos de tratamiento, siendo, por tanto, el adyuvante que más potenció la actividad humoral Th1 (figura 29).

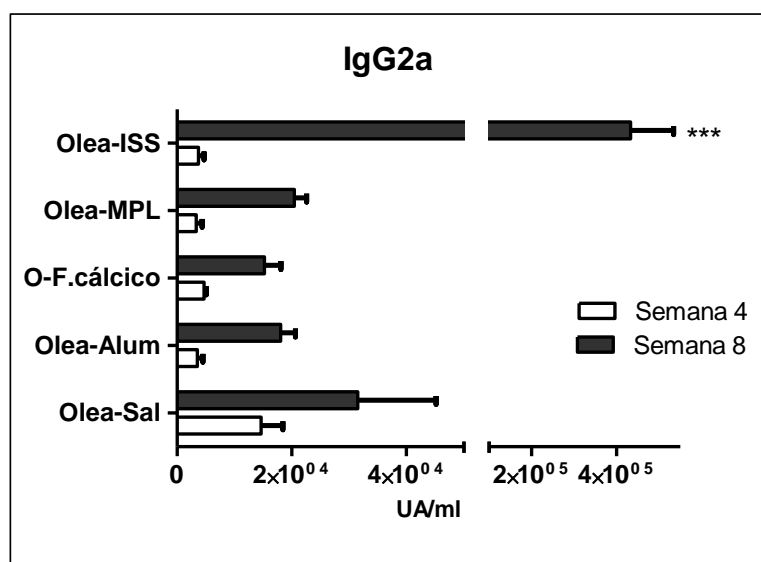


Figura 29. Producción de IgG2a antes y después de la administración de los distintos tratamientos (olea + adyuvante según grupo) en ratones sensibilizados a polen de olivo. A los ratones no tratados se les administró suero salino. El grupo de ratones tratados con olea e ISS produjo una respuesta de IgG2a significativamente mayor que el resto de grupos del estudio.

### 3.1.2 PRODUCCION EX VIVO DE CITOCINAS ESPECÍFICAS

Tras el sacrificio de los ratones, se cultivaron los esplenocitos durante 72 horas, estimulándolos con polen de olivo, para posteriormente realizar determinaciones de citocinas. La cuantificación de citocinas (IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  e IL-10) se realizó mediante método ELISA.

### 3.1.2.1 CITOCINAS Th2

Se realizaron determinaciones de citocinas IL-4 e IL-5 específicas para determinar el efecto de cada uno de los tratamientos sobre la respuesta inmune tipo Th2. Los resultados se detallan en la Tabla 13.

CITOCINAS Th2		
GRUPO	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)
<b>Olea+ISS</b>	16 ±10	367 ±120
<b>Olea+MPL</b>	13 ± 7	202 ±117
<b>Olea+F. cálcico</b>	12 ± 8	242 ±127
<b>Olea+Aluminio</b>	22 ± 12	270 ± 89
<b>Olea+Salino</b>	28 ± 6	265 ±89

*Tabla 13: Cuantificación de IL-4 e IL-5 específicas en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos de ratones sensibilizados a olea, que posteriormente han recibido diferentes tratamientos. Los valores se expresaron como media ± error estándar de la media.*

Todos los grupos de ratones sensibilizados a polen de olivo, independientemente del tratamiento que les fue administrado produjeron IL-4, sin que se pudieran encontrar diferencias entre los distintos tratamientos. A pesar de esto parece que existe una tendencia a menor producción de IL-4 en los ratones que reciben inmunoterapia que en los ratones sensibilizados no tratados, aunque sin alcanzar significación estadística (figura 30).

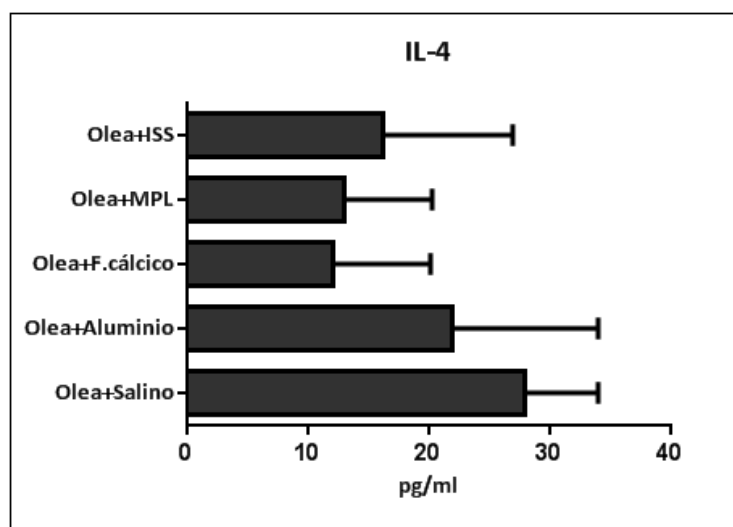


Figura 30. Representación gráfica de los valores de IL-4 obtenidos para los diferentes grupos de tratamiento en ratones sensibilizados a polen de *O. Europaea*.

En cuanto a IL-5, también fue detectada en el sobrenadante de esplenocitos de todos los grupos de ratones, sin encontrar diferencias entre los diferentes tipos de inmunoterapia administrados (figura 31).

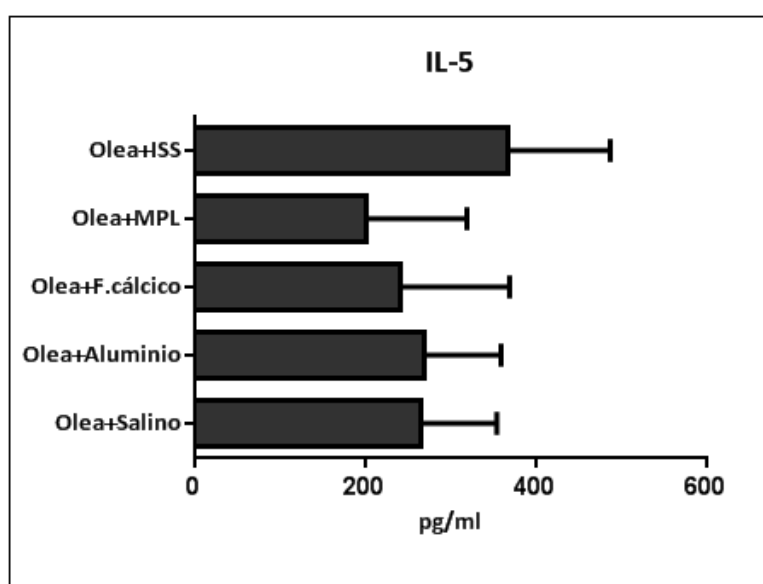


Figura 31. Producción de citocina IL-5 tras cultivo de esplenocitos estimulados con polen de *O. europaea*. Valores representados en pg/ml. No se observaron diferencias entre los diferentes grupos de tratamiento.

Todos los grupos de ratones produjeron IL-4 y IL-5 específicas. Estas citocinas juegan un papel importante respuesta inmune tipo Th2. Por tanto, ninguno de los tratamientos de nuestro estudio fue capaz de suprimir la respuesta alérgica Th2.

### 3.1.2.2 CITOCINAS Th1

Para evaluar si alguno de los tratamientos aplicados era capaz de inducir una respuesta inmune Th1, se realizaron determinaciones de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de los esplenocitos. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 14.

IFN- $\gamma$	
GRUPO	pg/ml
Olea+ISS	126 $\pm$ 34**
Olea+MPL	73 $\pm$ 21*
Olea+F. cálcico	14 $\pm$ 8
Olea+Aluminio	0 $\pm$ 0
Olea+Salino	0 $\pm$ 0

Tabla 14. Valores obtenidos en la determinación de IFN- $\gamma$  para los distintos grupos de tratamientos. Los datos están representados en pg/ml. La significación estadística se estimó mediante ANOVA (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

Los ratones tratados con secuencias inmunoestimuladoras produjeron unos niveles de IFN- $\gamma$  significativamente mayores que el resto de los grupos del estudio. El grupo de ratones tratados con MPL produjo una cantidad de IFN- $\gamma$ , significativamente mayor que el grupo tratado con olea e hidróxido de aluminio y que el grupo control de ratones alérgicos (figura 32). Por tanto, los adyuvantes derivados bacterianos (ISS y MPL) fueron los únicos capaces de inducir una respuesta Th1 en los ratones sensibilizados a *Olea europaea*

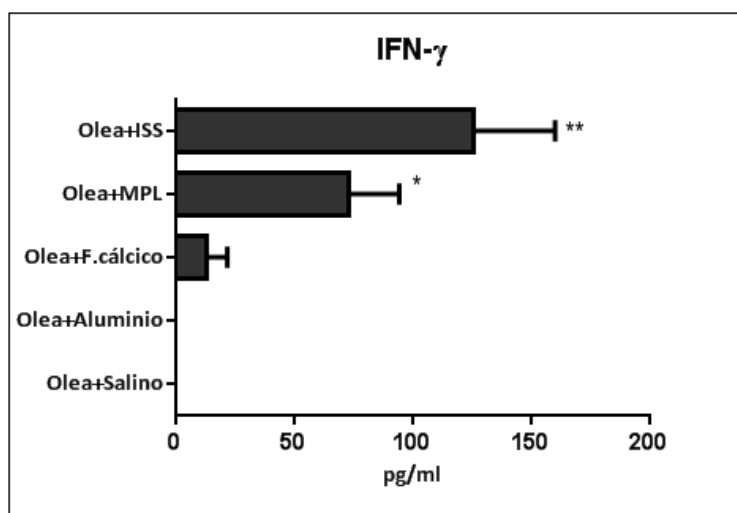


Figura 32. Producción de IFN- $\gamma$  tras cultivo de esplenocitos estimulados con polen de *O. Europaea*. Valores representados en pg/ml. El tratamiento con adyuvantes derivados bacterianos dio lugar a una secreción de IFN- $\gamma$  superior al resto de tratamientos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

### 3.1.2.3 CITOCINAS Treg

Para determinar el papel de los linfocitos T reguladores se realizaron determinaciones de de IL-10 específica en los esplenocitos de los distintos grupos de ratones (tabla 15).

IL10	
GRUPO	pg/ml
Olea+ISS	289 $\pm$ 131
Olea+MPL	53 $\pm$ 38
Olea+F. cálcico	157 $\pm$ 87
Olea+Aluminio	66 $\pm$ 66
Olea+Salino	129 $\pm$ 86

Tabla 15. Cuantificación de IL-10 en el sobrenadante de cultivos de esplenocitos de ratones sensibilizados a olivo y posteriormente inmunizados con los diferentes tratamientos. Los resultados se expresan media  $\pm$  error estándar de la media.

Existe una tendencia a mayor producción de IL-10 en los ratones tratados con secuencias inmunoestimuladoras, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamiento (figura 33).

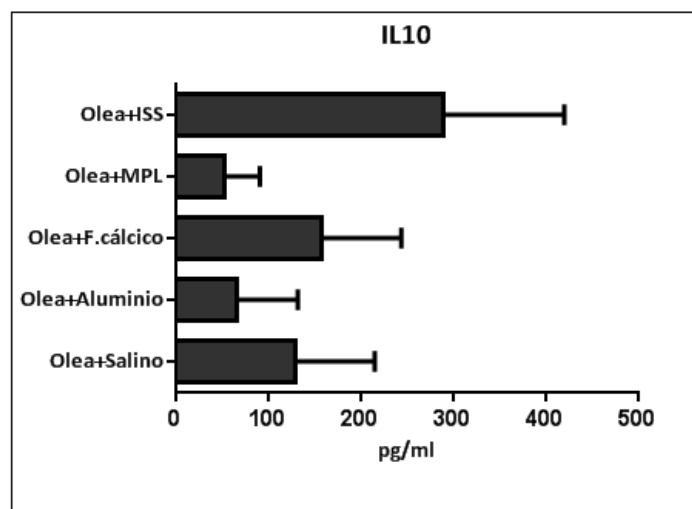


Figura 33. Producción de citocina IL-10 de los ratones tratados con diferentes grupos de tratamiento tras cultivo de esplenocitos estimulados con polen de *O. europaea*. Valores representados en pg/ml

### 3.2. INFLUENCIA DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE LA HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL DE LOS RATONES SENSIBILIZADOS A POLEN DE *OLEA EUROPAEA*

Se realizaron pruebas funcionales respiratorias a los ratones sensibilizados a olea y a los ratones control después de recibir las distintas pautas de tratamiento. Cuarenta y ocho y veinticuatro horas antes de la provocación inhalativa con metacolina, los ratones alérgicos recibieron, por vía intranasal, 15µg de olea en 30µl de suero salino, para provocar una respuesta inflamatoria de etiología alérgica en la vía aérea. Los ratones control, recibieron el mismo volumen de suero salino. Posteriormente, se les introdujo en cámaras de pletismografía individuales, en las cuales el animal estaba consciente y con libertad de movimientos. Se fueron administrando dosis crecientes de metacolina aerosolizada en PBS y se registraron durante tres minutos los cambios de presión que tenían lugar en la vía aérea del animal. La media de este periodo de registro se expresó como porcentaje de incremento del valor de Penh basal tras la inhalación de PBS para cada concentración de metacolina.

En la tabla 16 se detallan los resultados obtenidos:

Concentración metacolina	% Penh PBS					
	Olea+Salino	Olea+Aluminio	Olea+F.cálcico	Olea+MPL	Olea+ISS	Salino+Salino
Basal	93 ± 2	99 ± 6	102 ± 10	94 ± 3	94 ± 4	93 ± 3
PBS	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
3 mg/ml	141 ± 8	155 ± 10	155 ± 10	159 ± 11	146 ± 6	134 ± 3
6 mg/ml	174 ± 11	195 ± 10	195 ± 10	166 ± 10	155 ± 5	163 ± 8
12 mg/ml	237 ± 17	311 ± 42	311 ± 42	188 ± 12***	179 ± 12***	188 ± 11
24 mg/ml	250 ± 54	333 ± 38	333 ± 38	250 ± 25***	248 ± 25***	311 ± 20

Tabla 16. Resultados de la prueba de provocación inhalatoria con metacolina en los ratones sensibilizados a polen de *O. euroaea*, y tratados posteriormente con distintos tipos de inmunoterapia. Los valores se expresan en porcentaje de incremento del Penh obtenido con PBS para cada ratón y se representan como la media ± error estándar de la media de cada grupo. La significación estadística se estimó por ANOVA y fue de \*\*\* $p < 0,001$  para los grupos tratados con MPL e ISS.

Obtuvimos diferencias en las pruebas de hiperreactividad bronquial a metacolina entre los distintos grupos de ratones. Estas fueron mayores a medida que incrementábamos la concentración de metacolina inhalada.

Los datos muestran que, sólo los ratones tratados con derivados bacterianos (MPL e ISS) presentan una mejora significativa en la hiperreactividad bronquial (figura 34).

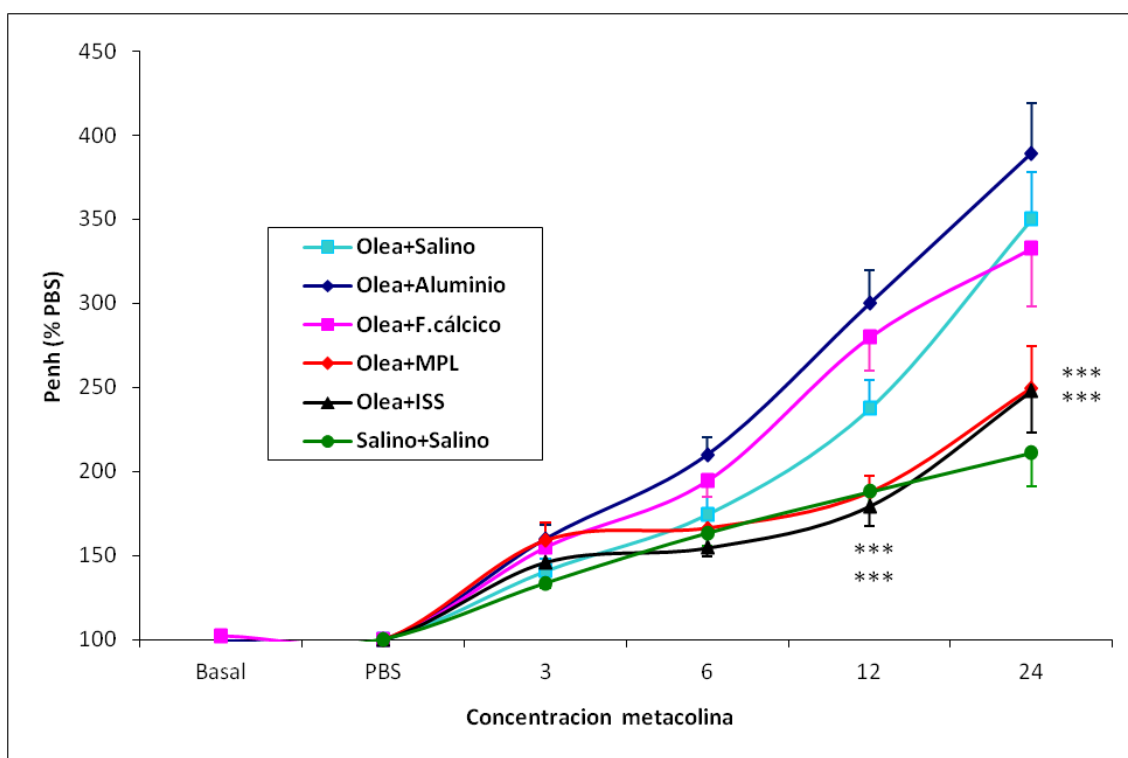


Figura 34. Prueba de metacolina en ratones sensibilizados a *O. europaea* y tratados con diferentes adyuvantes de inmunoterapia. La inhalación de metacolina en los ratones sensibilizados a olea que han sido tratados con MPL e ISS produce una broncoconstricción significativamente menor que en los ratones tratados con el resto de tratamientos.



### 3.3 EFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE LA HISTOLOGÍA PULMONAR EN RATONES SENSIBILIZADOS A POLEN DE *OLEA EUROPAEA*

El asma alérgico se caracteriza por la presencia de un infiltrado inflamatorio en la vía aérea, con predominio de linfocitos, eosinófilos y mastocitos, así como por un aumento de la secreción de moco local. Para comparar el efecto de los diferentes adyuvantes de inmunoterapia sobre la histología pulmonar se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina y PAS.

Los resultados se detallan en la tabla 17 y se representan en la figura 35.

HISTOLOGIA PULMONAR		
GRUPO	Inflamación pulmonar	Secreción moco
Olea+ISS	$1 \pm 0,2^*$	$0 \pm 0^*$
Olea+MPL	$1,6 \pm 0,2^*$	$0,3 \pm 0,2^*$
Olea+F.cálcico	$2,6 \pm 0,3$	$1 \pm 0,5$
Olea+Aluminio	$1,6 \pm 0,3$	$2 \pm 0,6$
Olea+Salino	$3 \pm 0,3^*$	$2,3 \pm 0,3^*$
Salino+Salino	$0 \pm 0^*$	$0 \pm 0^*$

Tabla 17. Valores obtenidos en la cuantificación en cortes pulmonares infiltrados inflamatorios (peribronquiales y perivasculares) y de células secretoras de moco. La inflamación fue valorada de forma semicuantitativa utilizando un sistema de puntuación: 0, normal; 1, pocas células; 2 anillo de células inflamatorias de 1 capa celular de grosor; 3 anillo de células inflamatorias de 2-4 capas celulares de grosor; 4 anillo de células inflamatorias de más de 4 capas celulares de grosor. La puntuación para evaluar la cantidad de células que contienen moco PAS positivo presentes en la vía aérea se determinó de la siguiente forma: 0, <0.5% de células PAS positivas, 1, de 5-25%; 2, de 25-50%; 3, de 50-75%; 4, >75%. Los valores se expresan mediante la media  $\pm$  EEM. La significación estadística se determinó mediante ANOVA y se consideraron significativos aquellos valores que alcanzaron  $*p<0.05$ .

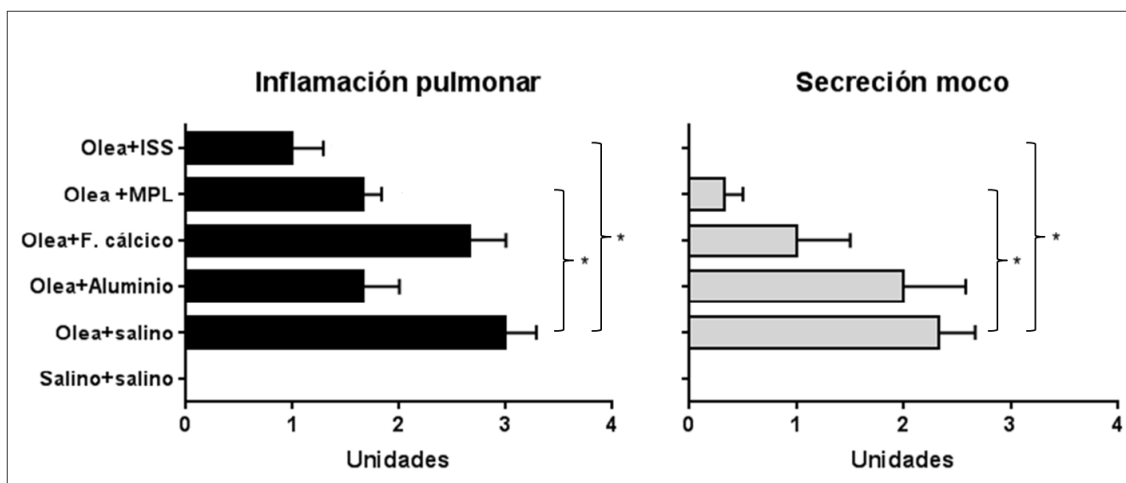
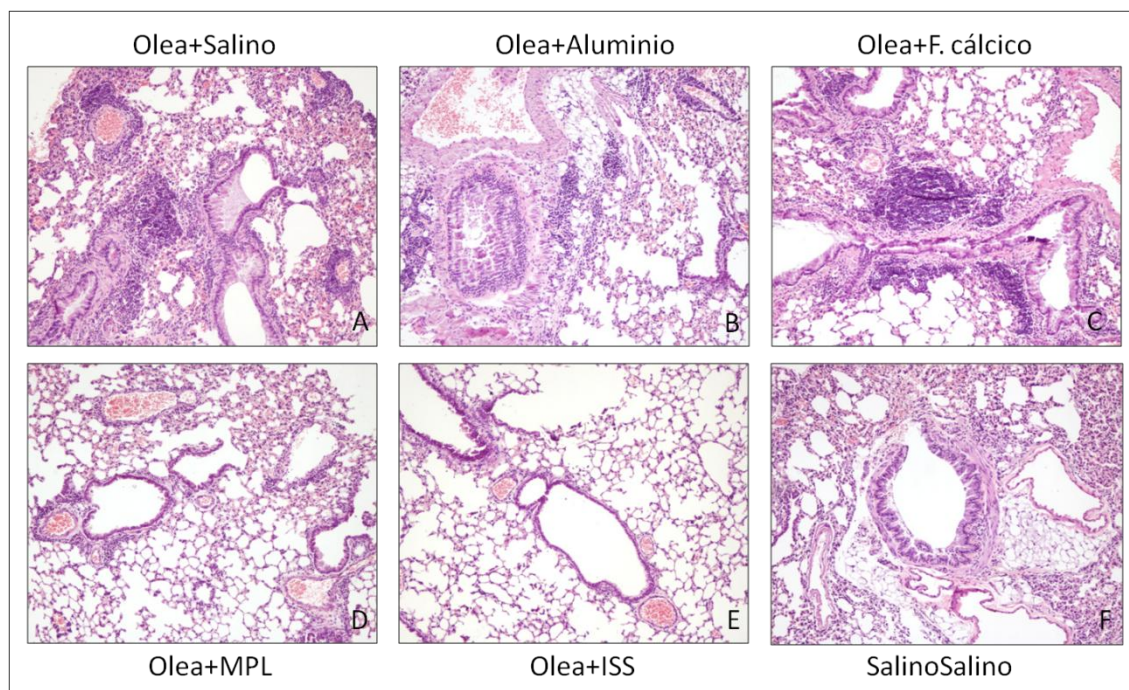


Figura 35. Representación gráfica de la cuantificación de inflamación y secreción de moco secciones pulmonares de ratones sensibilizados a olea que recibieron tres dosis de tratamiento con olea y diferentes adyuvantes. Los ratones que reciben olea con MPL o ISS presentan una inflamación pulmonar y producción de moco significativamente menor que los que reciben olea sin adyuvante (\* $p < 0.05$ ).

En la cuantificación de infiltrados de células inflamatorias, se obtuvo como resultado que los ratones sensibilizados a polen de *O. europaea*, que no recibieron tratamiento con ningún adyuvante (grupo olea + salino) presentaron una cantidad de infiltrados inflamatorios significativamente mayor que los que recibieron tratamiento con un adyuvante derivado bacteriano (MPL o ISS). Esto indica que el tratamiento con adyuvantes derivados bacterianos (MPL e ISS) mejoró la inflamación pulmonar de los ratones sensibilizados a *O. europaea*.

La figura 36 muestra imágenes representativas de los infiltrados inflamatorios presentes en cada uno de los grupos del estudio.



*Figura 36. Examen histológico del tejido pulmonar mediante tinción hematoxilina-eosina, para el estudio de inflamación pulmonar. Se muestran cortes representativos de cada uno de los grupos del estudio. Los ratones que recibieron olea junto con suero salino (A) presentaron una inflamación del tejido pulmonar significativamente mayor que los tratados con olea y MPL (D), olea e ISS y que los controles sanos (F) (aumentos A-F 100X).*

La secreción de moco se evaluó mediante tinciones PAS. Existe una clara tendencia a producir menor cantidad de moco por parte de los ratones tratados con olea más un adyuvante derivado bacteriano (MPL, ISS) que los que recibieron tratamiento con olea y aluminio o fosfato cálcico. Estos datos alcanzaron significación estadística en los grupos de ratones sensibilizados a olea y tratados con adyuvantes MPL o ISS, que secretaron una cantidad de moco significativamente menor que aquellos que no recibieron adyuvante (olea + salino). Destaca el caso del grupo de ratones tratado con olea + ISS, en los que no se objetivó producción de moco en las secciones pulmonares. La figura 37 muestra imágenes representativas de la secreción de moco en cada uno de los grupos del estudio.

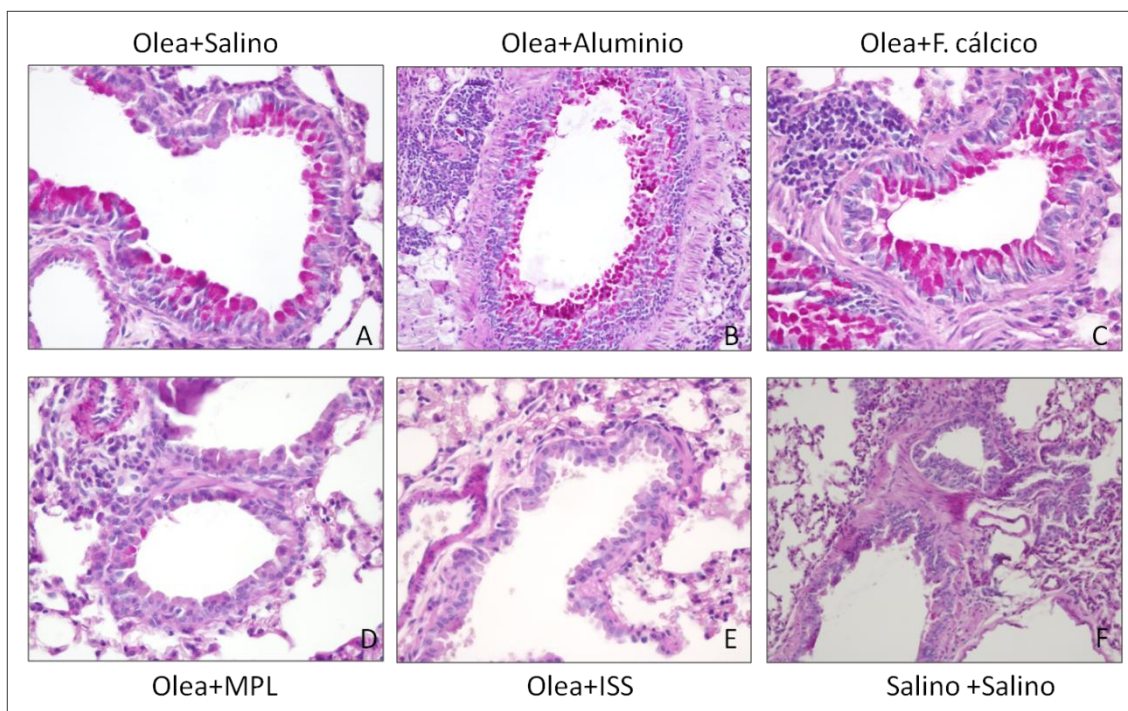


Figura 37. Examen histológico del tejido pulmonar mediante tinción PAS, para estudio de la producción de moco. Se muestran cortes representativos de cada uno de los grupos del estudio. Destaca la mayor producción de moco por parte de los ratones que recibieron tratamiento con olea + salino (A) que en aquellos ratones que recibieron tratamiento con olea + MPL (D) o ISS (E). La producción de moco de los ratones tratados con olea-ISS (E) fue nula, al igual que en los ratones sanos (F) (aumentos A y C 400x; B, D, E y F 200X)

## **DISCUSIÓN**

El asma bronquial es una patología que afecta a 300 millones de individuos a nivel mundial. Además se estima que en el año 2040, en torno al 40% de los europeos tendrá predisposición a desarrollar algún tipo de patología alérgica. Esto se traduce en un coste de varios billones de euros anuales. Los tratamientos que, además de controlar la sintomatología de los pacientes, consigan revertir de forma eficaz la enfermedad, serán capaces de disminuir el gasto farmacéutico, el gasto de los servicios de salud y el derivado del absentismo escolar y laboral.

En las patologías alérgicas respiratorias (rinitis y/o asma), la inmunoterapia específica es, en la actualidad, el tratamiento etiológico de elección. La eficacia de la ITE se basa en la inducción de tolerancia inmunológica (tolerancia clínica a largo plazo de los alérgenos), lo que implica una serie de cambios inmunológicos en la respuesta frente al alérgeno. Uno de los cambios fundamentales es la polarización de los linfocitos Th, desde la vía Th2 (responsable de la alergia y del asma) a la vía Th1 y Treg (protección frente a enfermedades alérgicas y regulación de la respuesta inmune). Por este motivo, en la actualidad, muchas líneas de investigación van dirigidas hacia el control del equilibrio Th2/Th1/Treg.

Los adyuvantes son sustancias que se administran en la inmunoterapia junto con el antígeno y cuya función es potenciar el efecto terapéutico de la proteína con la que es administrado. El adyuvante más ampliamente utilizado en ITE para enfermedades alérgicas es el hidróxido de aluminio, que paradójicamente se utiliza desde hace años para inducir una respuesta Th2 en animales, y conseguir modelos experimentales de inflamación bronquial.

En este trabajo se ha comparado el efecto de diferentes adyuvantes, tanto los clásicos, que se vienen utilizando desde hace años, como el hidróxido de aluminio y fosfato cálcico, como los nuevos adyuvantes derivados bacterianos, como el monofosforil lípido A (MPL) y las secuencias inmunoestimuladoras de ADN (ISS).

Para ello, primero se estudiaron los efectos de la administración de un aeroalérgeno frecuente, el polen de *Olea europaea*, junto con los distintos adyuvantes en ratones sanos. Posteriormente, se evaluó el efecto de la administración de inmunoterapia

específica con los diferentes adyuvantes en ratones alérgicos. Se utilizó un modelo murino de inflamación pulmonar por alergia a polen de *O. europaea*. A pesar de que la mayoría de modelos de asma utilizan la ovoalbúmina como alérgeno, se eligió el polen de olivo, por ser un aeroalérgeno (más parecido al asma en humanos) y ser uno de los pólenes más relevantes de nuestro entorno. Para ello se reprodujo el modelo desarrollado por Conejero y cols. en el año 2007 (43).

En diferentes grupos de ratones se han estudiado parámetros representativos de la respuesta inmunológica humoral y celular características de las vías Th1/Th2/Treg. Además se ha realizado un estudio no invasivo de la función pulmonar, para tener medidas objetivas de la hiperreactividad bronquial tras los diferentes tratamientos en animales vivos, y se ha estudiado la histología pulmonar, mediante microscopía óptica, para cuantificar la inflamación pulmonar en los diferentes grupos estudiados.

## **1. MODELO MURINO DE INFLAMACIÓN PULMONAR ALÉRGICA POR SENSIBILIZACIÓN A POLEN DE *OLEA EUROPAEA***

El desarrollo de modelos de enfermedad experimental en animales se ha demostrado útil para el estudio, tanto fisiopatológico como de posibles tratamientos en las enfermedades alérgicas.

Con el fin de estudiar el efecto, tanto *in vivo* como *in vitro*, de los diferentes adyuvantes del estudio en la respuesta inmune secundaria, desarrollamos un modelo murino de inflamación pulmonar alérgica. Para ello se reprodujo el modelo descrito por Conejero y cols. en el año 2007 (43). Este modelo utiliza como alérgeno un polen relevante para la patología alérgica en España, el polen de *O. europaea*, que además, al ser un aeroalérgeno habitual, hace que se asemeje más al asma alérgico humano que los modelos clásicos que utilizan ovoalbúmina. Como adyuvante se utilizó hidróxido de aluminio, conocido inductor de la respuesta inmune Th2 en modelos animales. La vía de sensibilización elegida fue la subcutánea, ya que se considera la más eficaz para generar una respuesta humoral con niveles elevados de IgE específica, induce una potente producción de citocinas Th2 por el bazo y una gran inflamación en el parénquima pulmonar (114) . Se eligieron ratones de la

cepa BALB/c porque, a pesar de que no desarrolla asma bronquial de forma espontánea, presenta una gran susceptibilidad para desarrollar una respuesta Th2.

Tras la coadministración de tres dosis de extracto crudo de polen de olivo e hidróxido de aluminio, se comprobó la inducción de la respuesta inflamatoria alérgica de tipo Th2 mediante la determinación sérica IgG1. Los ratones sensibilizados a polen de olivo produjeron niveles elevados de IgG1, que no se detectaron en los controles.

En los modelos de inflamación bronquial alérgica, para poder asemejarse a un fenotipo asmático, debe existir una mayor hiperreactividad bronquial en los ratones sensibilizados que en los sanos. Esto se comprobó mediante el estudio de la función pulmonar, obteniendo una hiperreactividad bronquial significativamente mayor en los ratones sensibilizados que en los controles.

Se ha reproducido por tanto, un modelo de inflamación pulmonar alérgica, en el que se ha conseguido inducir una respuesta inmunológica Th2 e hiperreactividad bronquial, consiguiendo así un modelo sobre el que estudiar los efectos del tratamiento con inmunoterapia de polen de olivo junto con diferentes adyuvantes.

## **2. INFLUENCIA DE LOS ADYUVANTES EN LA RESPUESTA INMUNE PRIMARIA**

### **2.1 RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRIMARIA**

Se ha evaluado la respuesta inmunológica que provoca la administración de un alérgeno, polen de olivo, junto con adyuvantes en ratones sanos. Se han realizado determinaciones séricas de IgG1 e IgG2a específicas para evaluar la respuesta humoral tipo Th2 y Th1 respectivamente.

El grupo de ratones sanos tratados con olea e hidróxido de aluminio, tras la provocación nasal con polen de *O. europaea*, produjo unos niveles de IgG1 mayores que el resto de tratamientos. La capacidad del hidróxido de aluminio de inducir una



respuesta inmunológica de tipo Th2, cuando se administra con un alérgeno, ha sido utilizada desde hace tiempo para conseguir modelos animales de inflamación bronquial alérgica. Este aumento de IgG1 tras administración de polen de *O. europaea* e hidróxido de aluminio ya había sido descrito Conejero y cols. (43) Otros grupos, que utilizaron alérgenos diferentes (polen de ambrosía u ovoalbúmina) y realizaron la sensibilización vía intraperitoneal también encontraron aumento de IgG1 (45, 115-116). Esta inducción de respuesta Th2 por parte del hidróxido de aluminio es una paradoja, ya que es el adyuvante más utilizado en inmunoterapia para enfermedades alérgicas, la cual pretende inhibir esta respuesta Th2, lo que evidencia la necesidad de buscar otros adyuvantes que sean capaces de modular la respuesta inmune hacia las vías Th1 y Treg e inhibir la vía Th2.

En cuanto a la respuesta humoral de tipo Th1 en ratones sanos, el tratamiento con olea más MPL y, sobre todo, olea más ISS, indujo una potente respuesta humoral tipo Th1, lo que se traduce en niveles elevados de IgG2a. Esta respuesta Th1 es mayor con estos tratamientos que con olea e hidróxido de aluminio o fosfato calcico, y se produjo tras la administración de las tres dosis, aumentando tras la provocación con el alérgeno. Esta respuesta humoral de predominio Th1 tras tratamiento con MPL fue constatada hace más de diez años por Wheeler y colaboradores (117), que describieron un aumento de IgG2a tras 2 inmunizaciones de ratones sanos con ovoalbúmina-MPL u OVA-MPL-tirosina. Más recientemente, un estudio de Wu y cols, también describe un aumento de IgG2a al administrar OVA con MPL por diferentes vías (s.c., i.p. o a través de la almohadilla plantar) de forma profiláctica a ratones que posteriormente son provocados con OVA (118).

La cantidad de IgG2a específica producida por nuestros ratones tratados con secuencias ISS y polen de olivo fue unas 20 veces mayor que en ratones tratados con polen de olivo y MPL, y unas 70 veces mayor que en los ratones tratados con polen de olivo e hidróxido de aluminio. De estos datos, se deduce que las secuencias ISS junto con un alérgeno inducen una respuesta inmunológica Th1 mucho más potente que el resto de tratamientos del estudio. El aumento de IgG2a junto con la menor producción de IgG1 por parte de los ratones tratados con ISS, hablan a favor de que este

tratamiento sería capaz de inclinar la balanza Th1/Th2 a favor del primero. Otros autores corroboran estos resultados en sus estudios en modelos murinos, en los que tras tratamiento con ISS y un antígeno clásico, ovoalbúmina, se produce una respuesta humoral de predominio Th1 (110, 119-120). Tighe y cols. demostraron este viraje de respuesta humoral de Th2 a Th1 en la respuesta inmune primaria, utilizando como antígeno *Amb a1*, el alérgeno mayor del polen de ambrosía, con una producción de IgG2a muy superior a la del grupo control (121). También estudios más recientes obtuvieron resultados similares a los nuestros. Destaca el realizado por Pico de Coaña y cols., en el que se utiliza como antígeno un alérgeno habitual, *Dermatophagoides pteronyssinus*, y obtiene en el grupo tratado con secuencias CpG un aumento en la producción de IgG, con elevación de la relación IgG2a/IgG1 (122).

## 2.2 RESPUESTA INMUNE CELULAR PRIMARIA

La IL-4 es la tiene un papel fundamental en la diferenciación de los linfocitos T vírgenes en linfocitos Th2, así como en el cambio de isotipo de IgG a IgE por los linfocitos B. Por esta razón se eligió esta citocina como representante de la respuesta Th2. Se realizaron determinaciones en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos estimulados con olea, tras las tres administraciones de tratamiento y la posterior provocación con el antígeno, obteniendo como resultado, a pesar de no alcanzar significación estadística, que sólo los grupos de ratones tratados con olea-hidróxido de aluminio u olea-fosfato cálcico fueron capaces de producir IL-4.

Se realizaron determinaciones de IFN- $\gamma$ , como citocina efectora principal de la vía Th1. Esta citocina es fundamental para la resolución de la respuesta inflamatoria alérgica, ya que disminuye la eosinofilia de la vía aérea y la hiperreactividad bronquial. Sólo los grupos tratados con derivados bacterianos (MPL e ISS) produjeron IFN- $\gamma$ , lo que apoya la teoría de que estos dos grupos de tratamiento son los únicos capaces de inducir una respuesta inmunológica Th1.

Otros grupos han estudiado, en modelos murinos, el efecto del MPL sobre las citocinas en la respuesta inmune primaria. De Becker y cols. realizaron estudios con células

dendríticas de origen esplénico, que estimularon con hemocianina de lapa y trataron o no con MPL. Obtuvieron resultados similares a los nuestros, es decir las células dendríticas tratadas con MPL producían mayor cantidad de IFN- $\gamma$  y menor cantidad de IL-4 que las no tratadas con MPL (123). Un trabajo reciente realizado en un modelo murino, estudió el efecto de la vacunación profiláctica utilizando OVA como alérgeno, con y sin MPL como adyuvante, y realizando posteriormente una provocación con OVA inhalada. Los ratones que recibieron OVA con MPL produjeron mayor cantidad de IFN- $\gamma$ , y menor de IL-4 que los que no recibieron MPL, además de encontrar un aumento de la relación IFN- $\gamma$ /IL-4, y por tanto un aumento de la respuesta Th1 (118). También existen estudios *in vitro* realizados con células mononucleares de sangre periférica de donantes humanos sanos. Se realizaron cultivos de células dendríticas, que fueron tratados con MPL, lipopolisacáridos (LPS) y medio, obteniendo como resultados que los sobrenadantes de células dendríticas tratados con MPL y LPS aumentaban la producción de IFN- $\gamma$ . También estudiaron la respuesta específica de linfocitos T estimuladas con toxoide tetánico, y tratadas con MPL, LPS o medio, obteniendo, en este caso, que el MPL aumenta la respuesta de linfocitos T, produciendo niveles elevados de IFN- $\gamma$  y de IL-5. Por tanto, bajo estas condiciones experimentales, encontraron que MPL potenciaba ambas respuestas de linfocitos T, Th1 y Th2 (124).

Existen también numerosos estudios acerca del efecto sobre el sistema inmune de la administración de CpG-ODN y un antígeno, que corroboran nuestros resultados. Redecke y cols. inmunizaron a diferentes grupos de ratones por vía s.c., uno de los grupos recibió ISS-ODN y ovoalbúmina, administrando posteriormente una dosis i.v. del alérgeno. El sobrenadante de esplenocitos de estos ratones estimulados *in vitro* con ovoalbúmina produjo niveles elevados de IFN- $\gamma$  (120). Alignani y su grupo estudiaron este efecto utilizando OVA como alérgeno y realizando la inmunización por vía oral, obteniendo también como resultados la inducción de respuesta Th1, ya que obtuvieron niveles elevados de IFN- $\gamma$  en ausencia de IL-5 (125). Un estudio reciente que utiliza como antígeno el alérgeno mayor recombinante del polen *Cynodon dactylon*, que es inyectado en los ratones por vía i.m. con diferentes adyuvantes o sin

ellos, encontró que los ratones que reciben adyuvantes, y en particular las secuencias CpG, producen elevados niveles de IFN- $\gamma$ , con una producción muy débil de IL-4 (126).

### **3. CAMBIOS INDUCIDOS POR LA CO-ADMINISTRACIÓN DE ADYUVANTE Y ALÉRGENO EN RATONES SANOS EN EL ÓRGANO DIANA: FUNCIÓN PULMONAR E HISTOPATOLOGÍA PULMONAR**

La hiperreactividad bronquial es uno de los factores determinantes de la hiperrespuesta pulmonar en el asma bronquial. La medición de la función pulmonar es una herramienta básica en el seguimiento de pacientes con asma bronquial, en el día a día de la práctica clínica. Por este motivo, se estudió cual sería el efecto sobre la respuesta bronquial, de la administración, en ratones sanos, de un alérgeno relevante para el asma en humanos, el polen de *O. europaea*, sólo o asociado a un adyuvante. No encontramos diferencias en la hiperreactividad bronquial de los grupos tratados sólo con el alérgeno, o con el alérgeno más un adyuvante (aluminio, fosfato cálcico, MPL o ISS). Conrad y cols publicaron resultados comparables, ya que no encontraron diferencias en la hiperreactividad bronquial de ratones que recibieron dosis repetidas de ovoalbúmina por vía s.c. y aquellos que recibieron, por vía i.d., OVA y aluminio. En cambio, este estudio encuentra una mayor hiperreactividad bronquial en los grupos que reciben OVA, con o sin adyuvante frente a los controles que no reciben alérgeno, lo que interpretan como que la administración del alérgeno sería suficiente para provocar un aumento de la hiperreactividad bronquial (116). En nuestros datos, existe una tendencia hacia la misma dirección: los grupos que recibieron olea, especialmente el que recibió olea con hidróxido de aluminio, presentaron una hiperreactividad bronquial que tendió a ser mayor que el grupo control. Wu y cols recientemente han realizado un estudio en el que comparan la hiperreactividad bronquial de ratones que reciben de forma profiláctica OVA y MPL u OVA y Aluminio, encontrando en estos últimos una hiperreactividad bronquial significativamente mayor que en los primeros, tras la provocación inhalada con OVA. En este estudio utilizaron diferentes vías de inmunización: s.c., i.p. y en la almohadilla plantar, pero sólo estudiaron la HRB en las dos últimas. (118). Un estudio de otro grupo, compara la inmunización de ratones

sanos con dos dosis administradas por vía s.c, separadas semanalmente, de OVA u OVA con ISS-ODN, provocándolos posteriormente con OVA intranasal en dos ocasiones, 7 días y 24 horas antes de la determinación de la hiperreactividad bronquial. Obtuvieron una menor hiperreactividad bronquial en aquellos ratones que habían sido inmunizados con OVA e ISS-ODN, que en los que sólo habían recibido OVA (120). En nuestro estudio no se han podido corroborar estos datos. Esto podría deberse a las diferencias en los métodos del estudio (diferente alérgeno, vía de administración del mismo, y numero de inmunizaciones y provocaciones).

La inflamación de la vía aérea es, junto con la hiperrespuesta bronquial, otra de las características esenciales en la patogenia del asma bronquial. Realizamos el estudio histológico con la finalidad de estudiar el efecto de la administración del alérgeno, junto con los diferentes adyuvantes del estudio, sobre la inflamación de la vía aérea. Todos grupos de ratones a los que se les administró polen de olivo, presentaron cierto grado de inflamación pulmonar, lo que se reflejó en la presencia de infiltrados celulares inflamatorios (peribronquiales y perivasculares). El empleo de adyuvantes, independientemente de la naturaleza de los mismos, no fue relevante para el grado de inflamación de la vía aérea tras la administración subcutánea del alérgeno. Otros autores tampoco encuentran diferencias en cuanto a la inflamación producida por la administración del alérgeno (OVA vía s.c.) y del alérgeno con un adyuvante (OVA y aluminio vía i.d.) en ratones sanos (116).

Estos datos apuntarían a que la administración de un alérgeno por vía s.c y posterior provocación nasal con el mismo, sería capaz de inducir por sí sola hiperreactividad bronquial e inflamación pulmonar y no sería determinante que el alérgeno estuviera asociado a un adyuvante.

#### 4. CAMBIOS INMUNOLÓGICOS PROVOCADOS POR LA CO-ADMINISTRACIÓN DE ADYUVANTE Y ALÉRGENO EN UN MODELO MURINO DE INFLAMACIÓN PULMONAR ALÉRGICA

##### 4.1 RESPUESTA INMUNE HUMORAL SECUNDARIA

Una vez establecido el modelo murino de asma bronquial, se planteó cual sería el efecto, a nivel inmunológico, de la administración de distintos tratamientos de inmunoterapia. Esto se realizó inyectando el alérgeno al que está sensibilizado el ratón, extracto de polen de *O. europaea*, junto con adyuvantes de diferentes propiedades inmunogénicas: hidróxido de aluminio, fosfato cálcico, MPL, ISS. Se administraron tres dosis de tratamiento, con periodicidad semanal, con una posterior provocación nasal con polen de olivo.

Cabe destacar que la inmunoterapia es un tratamiento inmunomodulador. Todos los grupos de ratones, previamente sensibilizados a polen olivo, aumentaron la producción de IgG<sub>1</sub> tras la administración de un tratamiento (extracto de polen de *O. europaea* más un adyuvante), sin que existieran diferencias entre los diferentes tratamientos.

En cuanto a la IgE, comparando los resultados obtenidos para los diferentes adyuvantes, se detectó una mayor producción de IgE en los ratones que habían sido tratados con olea e hidróxido de aluminio. Este dato apoya la teoría de que el hidróxido de aluminio es un adyuvante que desvía la respuesta inmune hacia la vía Th2, efecto que no es deseable en la inmunoterapia para las enfermedades alérgicas, aunque, paradójicamente, es el adyuvante más utilizado en las vacunas comercializadas en humanos a lo largo de los años. Por otro lado, en los grupos de ratones tratados con derivados bacterianos (ISS y MPL) se detectaron unos niveles de IgE menores que en el resto de grupos, lo que indica una disminución de la respuesta alérgica Th2.

Sólo los ratones tratados con secuencias ISS fueron capaces de producir una cantidad de IgG2a mayor que el resto de tratamientos (la IgG2a producida por los ratones alérgicos tratados con olivo y secuencias CpG fue, aproximadamente, 20 veces mayor que la producida por el resto de tratamientos). Esto indica la existencia de una potente respuesta Th1 (respuesta de protección frente a la enfermedad alérgica) que no encontramos en el

resto de tratamientos. En los ratones tratados con olea e ISS, a pesar de que existe un aumento de IgG1 tras el tratamiento, dado el gran aumento de IgG2a que encontramos, se produce una relación IgG2a/IgG1 superior a 2.5, lo que indica que el tratamiento con secuencias ISS dirige la respuesta de anticuerpos desde un perfil Th2 hacia una respuesta dominante Th1.

Otros grupos que han estudiado el efecto de la administración de secuencias CpG con un alérgeno en modelos animales de inflamación bronquial obtuvieron resultados comparables a los nuestros, con una potente inducción de IgG2a en los grupos tratados con estas secuencias bacterianas. En un estudio de Tighe y cols. Se sensibilizó un grupo de ratones con polen de ambrosia (*Amb a1*) e hidróxido de aluminio, y posteriormente se administró tratamiento con tres dosis i.d. de *Amb a1* junto con ISS-ODN. Este modelo es muy similar al de nuestro estudio, y corrobora nuestros resultados, ya que se encontraron niveles de IgG1 que aumentaron tras las tres dosis de tratamiento, tanto en los grupos tratados con ISS y el alérgeno, como en los controles, unos niveles de IgE menores en el grupo tratado con ISS y ambrosía, y una cantidad de IgG2a que sólo aumentó en el grupo tratado con ISS y ambrosia después de la provocación con esta última, concluyendo por tanto que el tratamiento con ISS y *Amb a1* en ratones sensibilizados induce una respuesta Th1 (121). Santeliz también estudió el efecto del tratamiento con secuencias inmunoestimuladoras y polen de ambrosía en ratones alérgicos, administrando sólo dos dosis i.d. de tratamiento, obteniendo resultados similares (45). Otros estudios que utilizan ovoalbúmina como alérgeno también han obtenido resultados similares, como el grupo de Kline, que encuentra una IgE menor en el grupo de ratones alérgicos tratados con ovoalbúmina e ISS (95).

Los niveles elevados de IgG1 que producen nuestros ratones tras el tratamiento con secuencias CpG, contrastan con estudios de otros autores en los que se produce una disminución de esta inmunoglobulina tras el tratamiento (127). En cambio, Hirose obtuvo resultados similares a los nuestros, con elevación de IgG2a, pero también de IgG1, tras administración de inmunoterapia con CpG-ODN en un modelo murino de inflamación bronquial por alergia a *Dermatophagoides farinae*, en el que se realizó la sensibilización vía intratraqueal. Atribuyen este efecto a la potente activación por parte de las secuencias CpG de los linfocitos B, que proliferan y secretan grandes cantidades de IgM, IL-6 e IL-10. Otras

explicaciones son las posibles diferencias en la inmunización o a la respuesta de anticuerpos al alérgeno en la fase primaria, ya que su modelo los ratones son sensibilizados mediante la administración de dosis repetidas de alérgeno, sin adyuvante asociado (128).

En cuanto a la repercusión humoral del tratamiento con inmunoterapia específica que utiliza ISS como adyuvante en humanos con historia de rinoconjuntivitis y asma por alergia a ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* o *farinae*), Senti y cols. encontraron que, tras tratamiento con inyecciones subcutáneas aplicadas cada 1-2 semanas, las subclases de IgG no se modificaban en la tercera semana de tratamiento, aumentaban en la sexta semana y alcanzaban un pico en la semana 10-12 de tratamiento. Todos los pacientes aumentaban sustancialmente los niveles de IgG1 e IgG4 específica a *Der-p* o *Der-f* y muchos de ellos también IgG2 e IgG3 específicas. Los niveles de IgE aumentaron durante la administración del tratamiento para disminuir al final del mismo (129). Estos resultados de Senti y cols., al igual que en nuestro modelo animal, hablan acerca del viraje de la respuesta humoral, desde Th2 a Th1, que produce el tratamiento con inmunoterapia específica que utiliza secuencias CpG como adyuvante.

Estudios acerca del efecto de MPL en animales sensibilizados, confirman algunos de nuestros resultados, como la disminución de IgE tras tratamiento con MPL en ratas sensibilizadas a hemocianina de lapa (117). Estudios en humanos con alergia estacional a gramíneas y tratados con inmunoterapia que contiene MPL como adyuvante, han mostrado desde la primera estación polínica cambios en la producción de inmunoglobulinas, hacia un perfil Th1: aumento de IgG2 y disminución de IgE respecto a los grupos tratados con placebo (70, 73). En nuestro trabajo, los ratones alérgicos a polen de olivo y tratados con olea y MPL también consiguen una reducción de IgE respecto al resto de tratamientos, pero no fueron capaces de producir IgG2a mayor que el tratamiento clásico con hidróxido de aluminio como adyuvante.

Un estudio reciente de Patel y cols. (130), realizado en pacientes con rinitis alérgica por polen de ambrosía, ha descrito una elevación en los niveles de IgG total y de las subclases IgG1 e IgG4, tres semanas después de haber recibido tratamiento con ITE de polen de ambrosía, con un alergoide que utiliza L-tirosina y MPL como adyuvantes. Esta elevación de IgG1 tras la administración del tratamiento es comparable a la obtenida en nuestro estudio.



## 4.2 PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN LA RESPUESTA INMUNE SECUNDARIA

La respuesta inmune celular tras la administración de olea y adyuvantes, en ratones sensibilizados, se estudió midiendo la producción de citocinas secretadas por los esplenocitos. En cuanto a las citocinas que modulan la respuesta Th2, se estudió la producción de IL-4, que modula la diferenciación de linfocito T hacia la vía Th2 y estimula los linfocitos B para el cambio a isotipo IgE; e IL-5, que es esencial para la maduración, diferenciación y supervivencia de los eosinófilos en la respuesta alérgica inflamatoria.

Todos los grupos de ratones produjeron IL-4 e IL-5. Ninguno de los tratamientos fue capaz de inhibir la producción de citocinas de la vía Th2. A pesar de no existir diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento, los ratones que recibieron algún tipo de inmunoterapia, tendieron a producir menor cantidad de IL-4 que aquellos ratones alérgicos que no habían sido tratados. Esto se podría interpretar como una disminución de la respuesta Th2 tras el tratamiento con inmunoterapia.

El IFN- $\gamma$  es la citocina que estimula a los linfocitos B para el cambio de isotipo a IgG2a, e inhibe por tanto la producción de IgE. El grupo de ratones tratado con ISS fue el que secretó una mayor cantidad de esta citocina. MPL también indujo una producción de IFN- $\gamma$  superior al resto de grupos de tratamiento. Por tanto, los grupos de ratones alérgicos que recibieron inmunoterapia con adyuvantes derivados bacterianos, produjeron un perfil de citocinas que estimularía la respuesta inmune Th1.

Diferentes estudios apoyan las propiedades estimuladoras de MPL hacia la vía Th1. Puggioni (131) estudió el efecto del MPL en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes sensibilizados a polen de gramíneas, resultando que las PBMC cultivadas con polen de gramíneas y MPL presentaron un aumento en la producción de INF- $\gamma$ . Otros autores también detectaron un aumento de IFN-  $\gamma$  en cultivos de linfocitos T periféricos de pacientes que habían recibido inmunoterapia específica con MPL y polen de abedul (72). En cambio, estos autores describen una disminución en la producción de IL-5, que no se ha podido corroborar.

Los linfocitos T reguladoras son fundamentales en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Son capaces de inhibir la inflamación mediada por linfocitos Th2, así como de

frenar la respuesta Th1. Actúan sobre mastocitos y basófilos, pero su principal objetivo son las células dendríticas. Se eligió realizar determinaciones de IL-10 para evaluar la actividad de los linfocitos Treg tras cada uno de los tratamientos, ya que, entre otras funciones, los linfocitos Treg inducen la formación de las células dendríticas tolerogénicas, en una vía dependiente de IL-10. No se encontraron diferencias significativas en la producción de IL-10 por los esplenocitos de ratones alérgicos a olivo tras la administración de los diferentes tratamientos aplicados en el estudio, a pesar de esto, existe una tendencia a mayor producción de IL-10 en los ratones tratados con ISS.

Otros autores tampoco han encontrado modificaciones significativas de la IL-10 tras tratamiento con MPL, tanto en cultivos celulares estimulados con alérgeno y MPL, como en cultivos de linfocitos T periféricos de pacientes polínicos que habían recibido pautas cortas de tratamiento con inmunoterapia con MPL como adyuvante (72, 131). Sin embargo, Rosewich y cols., sí consiguieron demostrar el papel de los linfocitos Treg en la inducción de tolerancia inmunológica, en pacientes que recibieron ITE con MPL. Este estudio incluía pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma estacional por alergia a polen de gramíneas, que recibieron inmunoterapia de gramíneas con MPL como adyuvante. Compararon la cantidad de linfocitos Treg mediante citometría de flujo, antes y después de cuatro inyecciones de la ITE. El porcentaje de linfocitos Treg aumentó el segundo año de tratamiento, pero no el primero (77). Esto puede explicar que tanto en nuestro estudio, como en los estudios de otros autores no se consiga demostrar la inducción de linfocitos Treg, porque sea preciso al menos dos años de tratamiento, o un mayor número de dosis, para conseguir este efecto. Otra explicación podría ser la vía de sensibilización. La sensibilización de los ratones mediante la administración s.c. del polen de olivo con hidróxido de aluminio, hace que el alérgeno no tenga contacto con las células dendríticas presentes en la mucosa respiratoria, lo que podría alterar la respuesta habitual de linfocitos Treg de la reacción alérgica.

Varios grupos han estudiado el efecto sobre las citocinas del tratamiento con inmunoterapia específica que utiliza ISS como adyuvante en modelos animales de hiperreactividad bronquial. La mayoría de estos grupos, corroboran nuestros resultados. Concluyen que el tratamiento de ratones sensibilizados a un alérgeno determinado (ambrosía, ovoalbúmina) y tratados posteriormente con inmunoterapia que contenga dicho

alérgeno e ISS como adyuvante, induce un aumento del perfil de citocinas Th1, lo que demuestran mediante determinaciones de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de esplenocitos o en LBA (45, 132). Esta inducción de respuesta Th1 también ha sido demostrada en un modelo murino de rinitis alérgica por sensibilización a un ácaro del polvo doméstico (*D. farinae*). Este estudio describe niveles de IFN- $\gamma$ , que se determinan en lavado nasal, más elevados en los ratones que reciben tratamiento con *D. farinae* unido a ISS, que en los controles (133). Los datos existentes en cuanto a la respuesta Th2 no son tan uniformes. Algunos grupos describen disminución de IL-5 (134) o de IL-4 (132) tras el tratamiento con alérgeno + ISS en ratones sensibilizados. Otros grupos, al igual que el nuestro estudio, no consiguen demostrar esta disminución de citocinas Th2 tras el tratamiento, como el de Santeliz (45) que no encuentra diferencias en las determinaciones de IL-5 que realiza en el cultivo del sobrenadante de esplenocitos de ratones sensibilizados a ambrosía y tratados con *Amb*-ISS, respecto al grupo control.

## **5. RESPUESTA PULMONAR A LA CO-ADMINISTRACIÓN DE ADYUVANTE Y ALÉRGENO EN UN MODELO MURINO DE INFLAMACIÓN PULMONAR ALÉRGICA: FUNCIÓN RESPIRATORIA E HISTOPATOLOGÍA**

Para evaluar la función pulmonar de los ratones sensibilizados a polen de olivo y posteriormente tratados con inmunoterapia específica con diferentes adyuvantes, se realizaron mediciones de hiperreactividad bronquial inespecífica mediante pletismografía corporal. Los grupos de ratones tratados con polen de olivo y un derivado bacteriano como adyuvante (MPL o ISS) presentaron una clara mejoría de la hiperreactividad bronquial, respecto al resto de grupos, y que esta diferencia alcanzó significación estadística cuando se alcanzó una concentración de metacolina inhalada de 12mg/ml y 24mg/ml.

Existen pocos estudios acerca del beneficio que ejerce sobre la función pulmonar, la inmunoterapia con diferentes adyuvantes. Un estudio en pacientes con asma por alergia a Parietaria, que recibieron durante tres años inmunoterapia de Parietaria con MPL, describe que 5 años después de terminar el tratamiento, el FEV1 del grupo control presentó una disminución significativa respecto al grupo que había recibido tratamiento (135). Existen

más datos sobre el efecto beneficioso sobre la función pulmonar de la inmunoterapia con ISS como adyuvante. La mayoría de estos estudios están realizados en modelos murinos de inflamación bronquial, que utilizan diferentes métodos de sensibilización, tanto en la vía de administración como en el tipo de alérgeno: sensibilización intratraqueal a ácaros (128), subcutánea a OVA con aluminio (134) o intraperitoneal a ambrosía con aluminio (45). A pesar de los diferentes métodos, todos ellos corroboran nuestros resultados, demostrando una disminución de hiperreactividad bronquial en los ratones, tras el tratamiento con inmunoterapia que utiliza secuencias CpG como adyuvante.

Una vez estudiada la función pulmonar, se investigó si el tratamiento con inmunoterapia específica, era capaz de mejorar la inflamación pulmonar característica del asma bronquial; y si el uso de diferentes adyuvantes modificaba el grado de inflamación en los pulmones de los ratones alérgicos a polen de olivo. Se encontró una cantidad de infiltrados pulmonares significativamente mayor en los ratones alérgicos no tratados que en los ratones sanos, y que en aquellos que recibieron tratamiento con olea y MPL o ISS. Siguiendo la misma línea, se objetivó una producción de moco menor en los ratones sensibilizados y tratados con inmunoterapia con adyuvantes derivados bacterianos (MPL e ISS), que en los ratones sensibilizados a polen de *O. europaea* y tratados sin adyuvante. De hecho, cabe destacar que no se encontró producción de moco en los ratones alérgicos que fueron tratados con olea e ISS. De estos datos se puede deducir que la inmunoterapia que utiliza adyuvantes derivados bacterianos sería capaz de reducir la inflamación pulmonar de los ratones alérgicos. No se encontraron diferencias con los otros dos adyuvantes del estudio (hidróxido de aluminio y fosfato cálcico). Estos datos obtenidos tienen como limitación el ser un modelo de inflamación pulmonar aguda, es decir, es posible que si se administraran los tratamientos con inmunoterapia específica durante más tiempo se obtuvieran mayores diferencias en la inflamación pulmonar entre los diferentes tratamientos. La mayoría de trabajos que estudian el efecto de la inmunoterapia sobre la inflamación pulmonar desde el punto de vista histológico, han utilizado como adyuvante secuencias CpG. Santeliz y cols. no encontraron diferencias significativas en cuanto al número de infiltrados celulares y la secreción de moco presentes en tejido pulmonar (45). Este modelo, al igual que el nuestro, es un modelo de inflamación bronquial agudo, en el que el sacrificio de los ratones se realiza cercano a la última provocación con el alérgeno. Otros estudios tuvieron en cuenta

este factor, como Ikeda y cols. que obtuvieron muestras de LBA seis días después de la administración del tratamiento con ISS y provocación con OVA, demostrando una disminución en el número de eosinófilos del LBA respecto a los ratones que no recibieron tratamiento (134). Otro trabajo que utilizó un modelo de asma crónico por sensibilización a hongos también consigue demostrar, tras tratamiento con inmunoterapia intranasal que utiliza CpG como adyuvante, una disminución en la fibrosis peribronquial y en la secreción de moco (136).

En la tabla 18 se resumen los principales efectos de los diferentes adyuvantes de inmunoterapia específica sobre la respuesta inmune secundaria e hiperreactividad bronquial.

	Th <sub>2</sub>	Th <sub>1</sub>	Treg	HRB
<b>Hidróxido de Aluminio</b>	↑	↔	↔	↔
<b>Fosfato cálcico</b>	↔	↔	↔	↔
<b>MPL</b>	↔	↑	↔	↓
<b>ISS</b>	↓	↑	↑	↓

Tabla 18. Influencia de los adyuvantes en un modelo murino de inflamación pulmonar alérgica

Este trabajo abre nuevas expectativas sobre futuros tratamientos de las enfermedades alérgicas, ya que pone de manifiesto la importancia del adyuvante.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES:

En el modelo animal:

1. El uso de adyuvantes asociados al alérgeno en inmunoterapia específica es relevante para su efecto sobre las enfermedades alérgicas. Los adyuvantes que potencian la respuesta inmune, mejoran la eficacia clínica.
2. La co-administración de adyuvantes con polen de *Olea europaea* en ratones sanos BALB/c tiene propiedades inmunomoduladoras. El hidróxido de aluminio induce una respuesta humoral Th2, mientras que la co-administración de un adyuvante derivado bacteriano (MPL o ISS) con olea provoca una respuesta humoral Th1.
3. En ratones sensibilizados a polen de *O. europaea*, el uso de derivados bacterianos (MPL e ISS) como adyuvantes de inmunoterapia redirige la respuesta inmune hacia la vía Th1.
4. La inmunoterapia con hidróxido de aluminio induce una potente respuesta humoral de tipo Th2 en ratones sensibilizados a polen de olivo. Los derivados bacterianos (MPL e ISS) no son capaces de suprimir completamente la respuesta humoral Th2, pero sí la reducen significativamente.
5. El empleo de inmunoterapia específica con olea y adyuvantes que contienen derivados bacterianos en su composición (MPL e ISS) en ratones sensibilizados a polen de *O. europaea* disminuyen la hiperreactividad bronquial y la inflamación pulmonar alérgica.
6. Los efectos de los adyuvantes MPL e ISS en la inmunoterapia específica en ratones sensibilizados a polen de *O. europaea* parecen ser más beneficiosos que los aportados por hidróxido de aluminio y fosfato cálcico.

## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Akdis CA. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nat Med*. 2012 May;18(5):736-49.
2. Soyer OU, Akdis M, Ring J, Behrendt H, Cramer R, Lauener R, et al. Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. *Allergy*. 2013 Feb;68(2):161-70.
3. Lambrecht BN, Hammad H. The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *Lancet*. 2010 Sep 4;376(9743):835-43.
4. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses. *Allergy*. 2011 May;66(5):579-87.
5. Zhao CQ, Li TL, He SH, Chen X, An YF, Wu WK, et al. Specific immunotherapy suppresses Th2 responses via modulating TIM1/TIM4 interaction on dendritic cells. *Allergy*. 2010 Aug;65(8):986-95.
6. Lei L, Zhang Y, Yao W, Kaplan MH, Zhou B. Thymic stromal lymphopoietin interferes with airway tolerance by suppressing the generation of antigen-specific regulatory T cells. *J Immunol*. 2011 Feb 15;186(4):2254-61.
7. Wisniewski J, Agrawal R, Woodfolk JA. Mechanisms of tolerance induction in allergic disease: integrating current and emerging concepts. *Clin Exp Allergy*. 2013 Feb;43(2):164-76.
8. Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. T helper 17 cells in airway diseases: from laboratory bench to bedside. *Chest*. 2013 Feb 1;143(2):494-501.
9. Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity*. 2010 Aug 27;33(2):192-202.
10. Melo RC, Liu L, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. *Allergy*. 2013 Mar;68(3):274-84.
11. Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, et al. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997 Sep;17(3):326-33.
12. Siracusa MC, Kim BS, Spergel JM, Artis D. Basophils and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Oct;132(4):789-801; quiz 788.
13. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One*. 2010;5(1):e8578.
14. Cakebread JA, Haitchi HM, Holloway JW, Powell RM, Keith T, Davies DE, et al. The role of ADAM33 in the pathogenesis of asthma. *Springer Semin Immunopathol*. 2004 Feb;25(3-4):361-75.
15. Guía Española para el manejo del Asma (GEMA). 2009. Disponible en: <http://www.gemasma.com/>
16. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004 May;59(5):469-78.
17. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, Global Initiative for Asthma (GINA) 2014. Disponible en: <http://www.ginasthma.org/>.
18. Rabe KF, Vermeire PA, Soriano JB, Maier WC. Clinical management of asthma in 1999: the Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study. *Eur Respir J*. 2000 Nov;16(5):802-7.
19. Akdis C, Papadopoulos N, Cardona V. Fighting allergies beyond symptoms: the European Declaration on Immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2011 Oct;41(10):2802-4.
20. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Oct;102(4 Pt 1):558-62.
21. Passalacqua G, Canonica GW. Specific immunotherapy in asthma: efficacy and safety. *Clin Exp Allergy*. 2011 Sep;41(9):1247-55.

22. Alvarez-Cuesta E, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling HJ, Valovirta E. Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. 2006;61 Suppl 82:1-20.
23. Burks AW, Calderon MA, Casale T, Cox L, Demoly P, Jutel M, et al. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 May;131(5):1288-96 e3.
24. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jan;127(1):18-27; quiz 8-9.
25. Shamji MH, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens. *Clin Exp Allergy*. 2011 Sep;41(9):1235-46.
26. Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy*. 2012;2(1):2.
27. Akdis CA, Akdis M, Blesken T, Wymann D, Alkan SS, Muller U, et al. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *J Clin Invest*. 1996 Oct 1;98(7):1676-83.
28. Golden DB, Meyers DA, Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Lichtenstein LM. Clinical relevance of the venom-specific immunoglobulin G antibody level during immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1982 Jun;69(6):489-93.
29. Muller U, Helbling A, Bischof M. Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom. *Allergy*. 1989 Aug;44(6):412-8.
30. Maggi E. T-cell responses induced by allergen-specific immunotherapy. *Clin Exp Immunol*. 2010 Jul 1;161(1):10-8.
31. Eifan AO, Shamji MH, Durham SR. Long-term clinical and immunological effects of allergen immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011 Dec;11(6):586-93.
32. Plewako H, Wosinska K, Arvidsson M, Bjorkander J, Skov PS, Hakansson L, et al. Basophil interleukin 4 and interleukin 13 production is suppressed during the early phase of rush immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;141(4):346-53.
33. Francis JN, Durham SR. Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004 Dec;4(6):543-8.
34. Ferrer M, Sanz MI, Gastaminza G, del Pozo V, de Souza J, Irache JM. [New pharmaceutical dosage forms for allergy treatment]. *An Sist Sanit Navar*. 2012 Jan-Apr;35(1):41-51.
35. Chen K, Xiang Y, Yao X, Liu Y, Gong W, Yoshimura T, et al. The active contribution of Toll-like receptors to allergic airway inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2011 Oct;11(10):1391-8.
36. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):637-50.
37. Heine H. TLRs, NLRs and RLRs: innate sensors and their impact on allergic diseases--a current view. *Immunol Lett*. 2011 Sep 30;139(1-2):14-24.
38. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54 Pt 1:1-13.
39. Glenny AT PG, Waddington H. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Path Bact*. 1926;29:38. Citado por: Hogenesch H. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. *Front Immunol*. 2012;3:406
40. Sledge RF. Treatment of hay-fever with alum precipitated pollen. *US Naval Med Bull*. 1938;36:18. Citado por: Francis JN, Durham SR. Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004 Dec;4(6):543-8.

41. Pfaar O, Jung K, Wolf H, Decot E, Kleine-Tebbe J, Klimek L, et al. Immunological effects and tolerability of a new fast up dosed immunologically enhanced subcutaneous immunotherapy formulation with optimized allergen/adjuvant ratio. *Allergy*. 2012 May;67(5):630-7.
42. Hogenesch H. Mechanism of immunopotential and safety of aluminum adjuvants. *Front Immunol*. 2012;3:406.
43. Conejero L, Higaki Y, Baeza ML, Fernandez M, Varela-Nieto I, Zubeldia JM. Pollen-induced airway inflammation, hyper-responsiveness and apoptosis in a murine model of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2007 Mar;37(3):331-8.
44. Levine BB, Vaz NM. Effect of combinations of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse. A potential mouse model for immune aspects of human atopic allergy. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1970;39(2-3):156-71.
45. Santeliz JV, Van Nest G, Traquina P, Larsen E, Wills-Karp M. Amb a 1-linked CpG oligodeoxynucleotides reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Mar;109(3):455-62.
46. Wilcock LK, Francis JN, Durham SR. Aluminium hydroxide down-regulates T helper 2 responses by allergen-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Allergy*. 2004 Sep;34(9):1373-8.
47. Moingeon P. Adjuvants for allergy vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2012 Oct;8(10):1492-8.
48. Jefferson T, Rudin M, Di Pietrantonj C. Adverse events after immunisation with aluminium-containing DTP vaccines: systematic review of the evidence. *Lancet Infect Dis*. 2004 Feb;4(2):84-90.
49. Exley C. Human exposure to aluminium. *Environ Sci Process Impacts*. 2013 Oct;15(10):1807-16.
50. Exley C. Aluminium adjuvants and adverse events in sub-cutaneous allergy immunotherapy. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2014;10(1):4.
51. Song BJ, Katial RK. Update on side effects from common vaccines. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2004 Nov;4(6):447-53.
52. Marcoval J, Moreno A, Mana J. Subcutaneous sarcoidosis localised to sites of previous desensitizing injections. *Clin Exp Dermatol*. 2008 Mar;33(2):132-4.
53. El S-C, Poelt P, Aberer W, Aberer E. Progressive circumscribed sclerosis--a novel side-effect of immunotherapy with aluminium-adsorbed allergen extracts. *Allergy*. 2009 Jun;64(6):965-7.
54. Ozden MG, Kefeli M, Aydin F, Senturk N, Canturk T, Turanli AY. Persistent subcutaneous nodules after immunotherapy injections for allergic asthma. *J Cutan Pathol*. 2009 Jul;36(7):812-4.
55. Guillard O, Fauconneau B, Pineau A, Marraud A, Bellocq JP, Chenard MP. Aluminium overload after 5 years in skin biopsy following post-vaccination with subcutaneous pseudolymphoma. *J Trace Elem Med Biol*. 2012 Oct;26(4):291-3.
56. Becaria A, Campbell A, Bondy SC. Aluminum as a toxicant. *Toxicol Ind Health*. 2002 Aug;18(7):309-20.
57. Campbell A, Bondy SC. Aluminum induced oxidative events and its relation to inflammation: a role for the metal in Alzheimer's disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2000 Jun;46(4):721-30.
58. Tomljenovic L, Shaw CA. Do aluminum vaccine adjuvants contribute to the rising prevalence of autism? *J Inorg Biochem*. 2011 Nov;105(11):1489-99.
59. Relyveld EH, Martin R, Raynaud M, Damas JP, Therond C, Henocq E, et al. [Calcium phosphate as adjuvant in vaccinations in man]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1969 Mar;116(3):300-26.

60. Leynadier F, Banoun L, Dollois B, Terrier P, Epstein M, Guinnepain MT, et al. Immunotherapy with a calcium phosphate-adsorbed five-grass-pollen extract in seasonal rhinoconjunctivitis: a double-blind, placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy*. 2001 Jul;31(7):988-96.
61. Rossi RE MG, Diana A, Monasterolo S, Delucchi M. Evaluation of two grass pollen extracts for immunotherapy by serum determinations of specific IgE and IgG4 antibodies towards purified Timothy grass pollen allergens (Phl p 1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 12) in patients undergoing hyposensitization treatment. *Allergol Int*. 2002;51(4):233 - 40.
62. Andre C DA, Cavagna S, Andre F. Effect of aluminium hydroxyde, calcium phosphate or liposomes on the in vitro production of IL-4 and IFN-gamma by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in allergic patients. *Allergy*. 2000;55 (Suppl. 63):173-4.
63. Lecadet A, Ickovic MR, Thibaudon M. [Specific desensitization with allergen extracts absorbed on calcium phosphate (Pasteur Institute). Clinical and biological study apropos of 107 cases]. *Allerg Immunol (Paris)*. 1988 Apr;20(4):153, 5-6, 8-60.
64. Goto N, Kato H, Maeyama J, Shibano M, Saito T, Yamaguchi J, et al. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine*. 1997 Aug-Sep;15(12-13):1364-71.
65. Persing DH, Coler RN, Lacy MJ, Johnson DA, Baldridge JR, Hershberg RM, et al. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol*. 2002;10(10 Suppl):S32-7.
66. Hopkins M, Lees BG, Richardson DG, Woroniecki SR, Wheeler AW. Standardisation of glutaraldehyde-modified tyrosine-adsorbed tree pollen vaccines containing the Th1-inducing adjuvant, monophosphoryl lipid A (MPL). *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2001 Nov-Dec;29(6):245-54.
67. Goldman M. Translational mini-review series on Toll-like receptors: Toll-like receptor ligands as novel pharmaceuticals for allergic disorders. *Clin Exp Immunol*. 2007 Feb;147(2):208-16.
68. Hauguel TM, Hackett CJ. Rationally-designed vaccine adjuvants: separating efficacy from toxicity. *Front Biosci*. 2008;13:2806-13.
69. Casale TB, Stokes JR. Future forms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jan;127(1):8-15; quiz 6-7.
70. Mothes N, Heinzkill M, Drachenberg KJ, Sperr WR, Krauth MT, Majlesi Y, et al. Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin Exp Allergy*. 2003 Sep;33(9):1198-208.
71. Drachenberg KJ, Heinzkill M, Urban E, Woroniecki SR. Efficacy and tolerability of short-term specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A (MPL) for children and adolescents. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2003 Sep-Oct;31(5):270-7.
72. Stuck BA, Schneider-Gene S, Schafer D, Klimek L, Harmann K. Short-term preseasonal immunotherapy with birch pollen allergoid plus monophosphoryl lipid A (MPL); influence on cytokine production of peripheral T-cells in patients with allergic rhinitis. *Allergy Clin Immunol Int-J World Allergy Org*. 2004;16:60-4.
73. Drachenberg KJ, Wheeler AW, Stuebner P, Horak F. A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy*. 2001 Jun;56(6):498-505.
74. McCormack PL, Wagstaff AJ. Ultra-short-course seasonal allergy vaccine (Pollinex Quattro). *Drugs*. 2006;66(7):931-8.
75. Scichilone N, Minaldi C, Santagata R, Battaglia S, Camarda G, Bellia V. Anti-inflammatory effects of pre-seasonal Th1-adjuvant vaccine to *Parietaria judaica* in asthmatics. *J Asthma Allergy*. 2011;4:19-25.

76. Scichilone N, Scalici V, Arrigo R, Bellia V. Clinical and anti-inflammatory effects of ultra-short preseasonal vaccine to *Parietaria* in asthma. *Ther Adv Respir Dis*. 2013 Aug; 7(4):207-15
77. Rosewich M, Schulze J, Fischer von Weikersthal-Drachenberg KJ, Zielen S. Ultra-short course immunotherapy in children and adolescents during a 3-yrs post-marketing surveillance study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010 Feb;21(1 Pt 2):e185-9.
78. Rosewich M, Lee D, Zielen S. Pollinex Quattro: An innovative four injections immunotherapy in allergic rhinitis. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 Jul; 9(7):1523-31
79. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Apr;72(4):955-62.
80. Tokunaga T, Yano O, Kuramoto E, Kimura Y, Yamamoto T, Kataoka T, et al. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol Immunol*. 1992;36(1):55-66.
81. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995 Apr 6;374(6522):546-9.
82. Fonseca DE, Kline JN. Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 Mar 28;61(3):256-62.
83. Higgins D, Marshall JD, Traquina P, Van Nest G, Livingston BD. Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2007 Oct;6(5):747-59.
84. Jurk M, Vollmer J. Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists for immune modulation. *BioDrugs*. 2007;21(6):387-401.
85. Vollmer J, Krieg AM. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 Mar 28;61(3):195-204.
86. Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol*. 2005 Sep;26(9):469-76.
87. Kline JN. Immunotherapy of asthma using CpG oligodeoxynucleotides. *Immunol Res*. 2007;39(1-3):279-86.
88. Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol*. 1998 Mar 15;160(6):2555-9.
89. Broide DH, Stachnick G, Castaneda D, Nayar J, Miller M, Cho JY, et al. Systemic administration of immunostimulatory DNA sequences mediates reversible inhibition of Th2 responses in a mouse model of asthma. *J Clin Immunol*. 2001 May;21(3):175-82.
90. Kline JN, Krieg AM, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Jain V, Businga TR. CpG oligodeoxynucleotides do not require TH1 cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Dec;104(6):1258-64.
91. Kline JN, Krieg AM. Toll-like receptor 9 activation with CpG oligodeoxynucleotides for asthma therapy. *Drug News Perspect*. 2008 Oct;21(8):434-9.
92. Jain VV, Kitagaki K, Businga T, Hussain I, George C, O'Shaughnessy P, et al. CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Dec;110(6):867-72.
93. Cho JY, Miller M, Baek KJ, Han JW, Nayar J, Rodriguez M, et al. Immunostimulatory DNA inhibits transforming growth factor-beta expression and airway remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 May;30(5):651-61.
94. Jain VV, Businga TR, Kitagaki K, George CL, O'Shaughnessy PT, Kline JN. Mucosal immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides reverses a murine model of chronic asthma induced by repeated antigen exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Nov;285(5):L1137-46.

95. Kline JN, Kitagaki K, Businga TR, Jain VV. Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Jul;283(1):L170-9.
96. Marshall JD, Abtahi S, Eiden JJ, Tuck S, Milley R, Haycock F, et al. Immunostimulatory sequence DNA linked to the Amb a 1 allergen promotes T(H)1 cytokine expression while downregulating T(H)2 cytokine expression in PBMCs from human patients with ragweed allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Aug;108(2):191-7.
97. Tulic MK, Fiset PO, Christodoulouopoulos P, Vaillancourt P, Desrosiers M, Lavigne F, et al. Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Feb;113(2):235-41.
98. Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, et al. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med*. 2006 Oct 5;355(14):1445-55.
99. Klimek L, Willers J, Hammann-Haenni A, Pfaar O, Stocker H, Mueller P, et al. Assessment of clinical efficacy of CYT003-QbG10 in patients with allergic rhinoconjunctivitis: a phase IIb study. *Clin Exp Allergy*. 2011 Sep;41(9):1305-12.
100. Krieg AM. CpG still rocks! Update on an accidental drug. *Nucleic acid therapeutics*. 2012 Apr;22(2):77-89.
101. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007 Jul;37(7):973-88.
102. Allen JE, Bischof RJ, Sucie Chang HY, Hirota JA, Hirst SJ, Inman MD, et al. Animal models of airway inflammation and airway smooth muscle remodelling in asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 2009 Oct;22(5):455-65.
103. Schroder NW, Maurer M. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. *Allergy*. 2007 Jun;62(6):579-90.
104. Hirota JA, Hackett TL, Inman MD, Knight DA. Modeling asthma in mice: what have we learned about the airway epithelium? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Apr;44(4):431-8.
105. Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, et al. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Feb 1;169(3):378-85.
106. Stevenson CS, Birrell MA. Moving towards a new generation of animal models for asthma and COPD with improved clinical relevance. *Pharmacology & therapeutics*. 2011 May;130(2):93-105.
107. Kumar RK, Foster PS. Are mouse models of asthma appropriate for investigating the pathogenesis of airway hyper-responsiveness? *Front Physiol*. 2012;3:312.
108. Bates JH, Irvin CG. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. *J Appl Physiol* (1985). 2003 Apr;94(4):1297-306.
109. Flood-Page P, Swenson C, Faierman I, Matthews J, Williams M, Brannick L, et al. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Dec 1;176(11):1062-71.
110. Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roman M, et al. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 May 14;93(10):5141-5.
111. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Sep;156(3 Pt 1):766-75.
112. Ford JG, Rennick D, Donaldson DD, Venkayya R, McArthur C, Hansell E, et al. IL-13 and IFN-gamma: interactions in lung inflammation. *J Immunol*. 2001 Aug 1;167(3):1769-77.
113. Myou S, Leff AR, Myo S, Boetticher E, Tong J, Meliton AY, et al. Blockade of inflammation and airway hyperresponsiveness in immune-sensitized mice by dominant-negative phosphoinositide 3-kinase-TAT. *J Exp Med*. 2003 Nov 17;198(10):1573-82.

114. Repa A, Wild C, Hufnagl K, Winkler B, Bohle B, Pollak A, et al. Influence of the route of sensitization on local and systemic immune responses in a murine model of type I allergy. *Clin Exp Immunol*. 2004 Jul;137(1):12-8.
115. Roman BS, Espuelas S, Gomez S, Gamazo C, Sanz ML, Ferrer M, et al. Intradermal immunization with ovalbumin-loaded poly-epsilon-caprolactone microparticles conferred protection in ovalbumin-sensitized allergic mice. *Clin Exp Allergy*. 2007 Feb;37(2):287-95.
116. Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, Kilic A, Sudowe S, Lunow M, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy*. 2009 Aug;39(8):1246-54.
117. Wheeler AW, Marshall JS, Ulrich JT. A Th1-inducing adjuvant, MPL, enhances antibody profiles in experimental animals suggesting it has the potential to improve the efficacy of allergy vaccines. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001 Oct;126(2):135-9.
118. Wu CJ, Chou HW, Liou CJ, Shen JJ, Wang LC, Kuo ML. Prophylactic vaccination with adjuvant monophosphoryl lipid A prevents Th2-mediated murine asthmatic responses. *J Asthma*. 2013 May;50(4):327-33.
119. Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med*. 1997 Aug;3(8):849-54.
120. Redecke V, Hacker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):2739-43.
121. Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, Van Nest G, Tuck S, Eiden JJ, et al. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jul;106(1 Pt 1):124-34.
122. Pico de Coana Y, Carnes J, Gallego MT, Alonso C, Parody N. Modulation of the humoral response to *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens in BALB/c mice by extract modification and adjuvant use. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;157(4):331-8.
123. De Becker G, Moulin V, Pajak B, Bruck C, Francotte M, Thiriart C, et al. The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. *Int Immunol*. 2000 Jun;12(6):807-15.
124. Ismaili J, Rennesson J, Aksoy E, Vekemans J, Vincart B, Amraoui Z, et al. Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol*. 2002 Jan 15;168(2):926-32.
125. Alignani D, Maletto B, Liscovsky M, Ropolo A, Moron G, Pistoiresi-Palencia MC. Orally administered OVA/CpG-ODN induces specific mucosal and systemic immune response in young and aged mice. *J Leukoc Biol*. 2005 Jun;77(6):898-905.
126. Huang CF, Chu CH, Wu CC, Chang ZN, Chue FL, Peng HJ. Induction of Specific Th1 Responses and Suppression of IgE Antibody Formation by Vaccination with Plasmid DNA Encoding Cyn d 1. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012 Jan 25;158(2):142-50.
127. Takabayashi K, Libet L, Chisholm D, Zubeldia J, Horner AA. Intranasal immunotherapy is more effective than intradermal immunotherapy for the induction of airway allergen tolerance in Th2-sensitized mice. *J Immunol*. 2003 Apr 1;170(7):3898-905.
128. Hirose I, Tanaka H, Takahashi G, Wakahara K, Tamari M, Sakamoto T, et al. Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on house dust mite-induced airway inflammation in mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;147(1):6-16.
129. Senti G, Johansen P, Haug S, Bull C, Gottschaller C, Muller P, et al. Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial. *Clin Exp Allergy*. 2009 Apr;39(4):562-70.

130. Patel P, Holdich T, Fischer von Weikersthal-Drachenberg KJ, Huber B. Efficacy of a short course of specific immunotherapy in patients with allergic rhinoconjunctivitis to ragweed pollen. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jan;133(1):121-9 e1-2.
131. Puggioni F, Durham SR, Francis JN. Monophosphoryl lipid A (MPL) promotes allergen-induced immune deviation in favour of Th1 responses. *Allergy*. 2005 May;60(5):678-84.
132. Ashino S, Wakita D, Zhang Y, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. CpG-ODN inhibits airway inflammation at effector phase through down-regulation of antigen-specific Th2-cell migration into lung. *Int Immunol*. 2008 Feb;20(2):259-66.
133. Mo JH, Park SW, Rhee CS, Takabayashi K, Lee SS, Quan SH, et al. Suppression of allergic response by CpG motif oligodeoxynucleotide-house-dust mite conjugate in animal model of allergic rhinitis. *Am J Rhinol*. 2006 Mar-Apr;20(2):212-8.
134. Ikeda RK, Nayar J, Cho JY, Miller M, Rodriguez M, Raz E, et al. Resolution of airway inflammation following ovalbumin inhalation: comparison of ISS DNA and corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Jun;28(6):655-63.
135. Musarra A, Bignardi D, Troise C, Passalacqua G. Long-lasting effect of a monophosphoryl lipid-adjuvanted immunotherapy to parietaria. A controlled field study. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2010 Jun;42(3):115-9.
136. Ramaprakash H, Hogaboam CM. Intranasal CpG therapy attenuated experimental fungal asthma in a TLR9-dependent and -independent manner. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152(2):98-112.